



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

|   |           |   |
|---|-----------|---|
| <p>(51) 国際特許分類7<br/>C12N 15/53, 9/04, 1/21, C12P 19/02, 7/60 // (C12N 9/04, C12R 1:01) (C12N 15/53, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:02) (C12N 1/21, C12R 1:38)</p>  | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号<br/><b>WO00/55329</b></p> <p>(43) 国際公開日<br/>2000年9月21日(21.09.00)</p>   |
| <p>(21) 国際出願番号<br/>PCT/JP00/01608</p> <p>(22) 国際出願日<br/>2000年3月16日(16.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ<br/>特願平11/72810 1999年3月17日(17.03.99) JP<br/>特願平11/224679 1999年8月6日(06.08.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)<br/>藤沢薬品工業株式会社<br/>(FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP)<br/>〒541-8514 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号<br/>Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および<br/>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)<br/>柴田 孝(SHIBATA, Takashi)(JP/JP)<br/>〒464-0823 愛知県名古屋市中種区松竹町1-38<br/>ブリオール牧野3B Aichi, (JP)<br/>市川千代(ICHIKAWA, Chiyo)(JP/JP)<br/>〒461-0001 愛知県名古屋市中東区泉2-4-3 ライジング泉601<br/>Aichi, (JP)</p>  |           | <p>松浦光高(MATSUURA, Mitsutaka)(JP/JP)<br/>〒491-0057 愛知県一宮市今伊勢町宮後字宮代62-1<br/>ソレーユ宮代305 Aichi, (JP)<br/>野口祐嗣(NOGUCHI, Yuji)(JP/JP)<br/>〒490-1114 愛知県海部郡甚目寺町大字下萱津字五反田31-1<br/>Aichi, (JP)<br/>斎藤善正(SAITO, Yoshimasa)(JP/JP)<br/>〒666-0151 兵庫県川西市美山台1-4-20 Hyogo, (JP)<br/>山下道雄(YAMASHITA, Michio)(JP/JP)<br/>〒305-0044 茨城県つくば市並木3-11-11 Ibaraki, (JP)<br/>高田葉子(TAKATA, Yoko)(JP/JP)<br/>〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島2-14-10-405 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人<br/>高島 一(TAKASHIMA, Hajime)<br/>〒541-0046 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号<br/>(湯木ビル) Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類<br/>国際調査報告書</p> |
| <p>(54)Title: <b>SORBITOL DEHYDROGENASE, GENE ENCODING THE SAME AND USE THEREOF</b></p> <p>(54)発明の名称 ソルビトールデヒドロゲナーゼ、それをコードする遺伝子およびそれらの用途</p> <p>(57) Abstract<br/>A gene encoding D-sorbitol dehydrogenase (SLDH); a process for producing SLDH by culturing host cells transformed by an expression vector having the above gene; and a process for producing L-sorbose or 2-keto-L-gulonic acid (2KLGA) by using the above culture. 2KLGA is an important intermediate in the production of L-ascorbic acid. Thus, a process for producing L-ascorbic acid from the 2KLGA obtained by the above process is also provided.</p> |           |   |

(57)要約

本発明は、D-ソルビトールデヒドロゲナーゼ (SLDH) をコードする遺伝子、該遺伝子を発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養することによるSLDHの製造方法、ならびに該培養物を用いたL-ソルボースまたは2-ケト-L-グルロン酸 (2KLG A) の製造方法を提供する。2KLG AはL-アスコルビン酸の製造における重要な中間体である。したがって、本発明はまた、上記方法により得られた2KLG AからのL-アスコルビン酸の製造方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

|                 |            |                   |               |
|-----------------|------------|-------------------|---------------|
| AE アラブ首長国連邦     | DM ドミニカ    | KZ カザフスタン         | RU ロシア        |
| AG アンティグア・バーブーダ | DZ アルジェリア  | LC セントルシア         | SD スーダン       |
| AL アルバニア        | EE エストニア   | LI リヒテンシュタイン      | SE スウェーデン     |
| AM アルメニア        | ES スペイン    | LK スリ・ランカ         | SG シンガポール     |
| AT オーストリア       | FI フィンランド  | LR リベリア           | SI スロヴェニア     |
| AU オーストラリア      | FR フランス    | LS レソト            | SK スロヴァキア     |
| AZ アゼルバイジャン     | GA ガボン     | LT リトアニア          | SL シエラ・レオネ    |
| BA ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB 英国      | LU ルクセンブルグ        | SN セネガル       |
| BB バルバドス        | GD グレナダ    | LV ラトヴィア          | SZ スワジランド     |
| BE ベルギー         | GE グルジア    | MA モロッコ           | TD チャード       |
| BF ブルキナ・ファソ     | GH ガーナ     | MC モナコ            | TG トーゴ        |
| BG ブルガリア        | GM ガンビア    | MD モルドヴァ          | TJ タジキスタン     |
| BJ ベナン          | GN ギニア     | MG マダガスカル         | TM トルクメニスタン   |
| BR ブラジル         | GR ギリシャ    | MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TR トルコ        |
| BY ベラルーシ        | GW ギニア・ビサウ | 共和国               | TT トリニダード・トバゴ |
| CA カナダ          | HR クロアチア   | マリ                | TZ タンザニア      |
| CF 中央アフリカ       | HU ハンガリー   | MN モンゴル           | UA ウクライナ      |
| CG コンゴ          | ID インドネシア  | MR モーリタニア         | UG ウガンダ       |
| CH スイス          | IE アイルランド  | MW マラウイ           | US 米国         |
| CI コートジボアール     | IL イスラエル   | MX メキシコ           | UZ ウズベキスタン    |
| CM カメルーン        | IN インド     | MZ モザンビーク         | VN ヴェトナム      |
| CN 中国           | IS アイスランド  | NE ニジェール          | YU ユーゴスラヴィア   |
| CR コスタ・リカ       | IT イタリア    | NL オランダ           | ZA 南アフリカ共和国   |
| CU キューバ         | JP 日本      | NO ノールウェー         | ZW ジンバブエ      |
| CY キプロス         | KE ケニア     | NZ ニュー・ジーランド      |               |
| CZ チェッコ         | KG キルギスタン  | PL ポーランド          |               |

## 明 細 書

ソルビトールデヒドロゲナーゼ、それをコードする遺伝子およびそれらの用途

## 技術分野

本発明は、新規ソルビトールデヒドロゲナーゼ（本発明において、ソルビトールデヒドロゲナーゼとはD-ソルビトールを酸化してL-ソルボースに変換する反応を触媒し得る酵素を意味するものとする；以下、SLDHという）、それをコードする遺伝子、該遺伝子を用いた遺伝子操作によるL-ソルボースおよび2-ケト-L-グロン酸（以下、2KLG Aという）の製造方法、並びにそれらの製造に関わる発現系に関する。また、本発明は上記方法により得られる2KLG Aを利用したL-アスコルビン酸またはその塩の製造方法に関する。

## 背景技術

L-ソルボースはライヒシュタイン法によるL-アスコルビン酸(ビタミンC)合成における重要な中間体である(図1を参照)。D-ソルビトールを化学的に酸化すると生成物の約半分がD-ソルボースになるのに対し、SLDH活性を有する微生物にD-ソルビトールを接触させると約95%の収率でL体のみが得られることから、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する工程には従来より発酵法が用いられてきた。

一方、2KLG Aは、工業的にはL-ソルボースを化学的に酸化することにより合成されている。L-ソルボースデヒドロゲナーゼ(SDH)およびL-ソルボソンデヒドロゲナーゼ(SNDH)による2段階の酵素的酸化反応を経由してL-ソルボースを2KLG Aに変換する微生物が知られてはいるが、いずれも2KLG Aの生産量が低いのが現状である。

発酵法によって2KLG Aを従来よりも効率よく生成させ得る方法として、S

L D H遺伝子を単離し、これをS D HおよびS N D H活性を有する微生物に導入することによりD-ソルビトールから2 K L G Aを合成することができる組換え微生物を作製し、該微生物にD-ソルビトールを接触させる方法が考えられる。

これまでにいくつかのタイプのS L D Hが単離されている[*Agric. Biol. Chem.*, 46(1), 135-141 (1982); *Biokhimiia*, 43(6), 1067-1078 (1978); *J. Biol. Chem.*, 224, 323 (1957); *J. Biol. Chem.*, 226, 301 (1957); *J. Bacteriol.*, 71, 737 (1956) ]。本発明者らはすでに、グルコノバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) に属する菌株から、膜結合型で大小2つのサブユニットからなり、さらにチトクロームc様ポリペプチドと結合して作用するS L D Hをコードする遺伝子を単離している (国際特許出願公開W O 9 9 / 2 0 7 6 3号公報)。しかしながら、他のタイプのS L D H遺伝子のクローニングについては、これまで報告がなされていない。

したがって、本発明の目的は、2 K L G Aの発酵生産に有用な新規S L D H遺伝子を提供することであり、また、該遺伝子で形質転換された宿主微生物、特にS D HおよびS N D H活性をすでに有する宿主に該遺伝子を導入した形質転換体、あるいはS D H遺伝子およびS N D H遺伝子とともに該遺伝子を導入した形質転換体を提供することである。さらに、本発明の目的は、該微生物を用いてD-ソルビトールからL-ソルボースまたは2 K L G Aを製造する方法を提供することであり、さらに該方法により得られた2 K L G AからのL-アスコルビン酸の製造方法を提供することである。また、本発明の別の目的は、該S L D H遺伝子で形質転換された宿主微生物の培養による組換えS L D Hの製造方法並びに該S L D Hを用いた酵素法によるL-ソルボースの製造方法を提供することである。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、S L D H活性を有するグルコノバクター属の菌株の染色体DNAライブラリーから、該酵素

のコード領域を含むDNAをクローニングすることに成功した。シーケンスの結果、該DNAは本発明者らが以前に単離したSLDH遺伝子とは全く異なる、新規なSLDH遺伝子を含むことが確認された。さらに、本発明者らは該DNAを含む発現ベクターでシュードモナスを形質転換し、該組換えシュードモナスの培養物から組換えSLDHを精製することに成功した。また、該DNAを含む発現ベクターで形質転換されたシュードモナスを、SDH遺伝子およびSNDH遺伝子を含む発現ベクターでさらに形質転換し、該形質転換体の培養物を用いてD-ソルビトールを2KLG Aに効率よく変換することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下に示す通りである。

(1) 下記の理化学的性質を有するSLDH。

- (a) 作用：D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する
- (b) 分子量：約54kDa
- (c) 補酵素：NAD(P)<sup>+</sup>依存性
- (d) 基質特異性：ソルビトール、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化し、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールに作用しない

(2) グルコノバクター・オキシダンスG624株由来である上記(1)のSLDH。

(3) 上記(2)記載のSLDHと分子進化上、同一の遺伝子を起源とするSLDH。

(4) グルコノバクター属に属する細菌由来である上記(3)記載のSLDH。

(5) 以下の(a) または(b) の蛋白質であるSLDH。

- (a) 配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質
- (b) 上記(a) のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなり、且つD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する蛋白質

(6) 上記(1)～(5)のいずれかのSLDHをコードするDNA。

(7) 以下の(a)または(b)のDNAである上記(6)のDNA。

(a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列からなるDNA

(b) 上記(a)の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA

(8) グルコノバクター属に属する細菌由来である上記(6)または(7)のDNA。

(9) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列からなるDNAおよびその部分DNAとハイブリダイズし得るDNAであって、SLDH活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。

(10) 上記(9)の遺伝子によってコードされ、SLDH活性を有するグルコノバクター属由来の蛋白質。

(11) 以下の(a)または(b)のDNAからなるプロモーター遺伝子。

(a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号1～536で示される塩基配列からなるDNA

(b) 上記(a)の塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも1種の微生物においてプロモーター活性を有するDNA

(12) 上記(6)～(9)のいずれかのDNAを含む組換えベクター。

(13) 上記(6)～(9)のいずれかのDNAを含む発現ベクター。

(14) SDHをコードするDNAおよび／またはSNDHをコードするDNAをさらに含む上記(13)の発現ベクター。

(15) 上記(13)または(14)の発現ベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

(16) 大腸菌、シュードモナス属、グルコノバクター属、アセトバクター属お

よびシュードグルコノバクター属からなる群より選択される属に属する上記（１５）の形質転換体。

（１７）該形質転換体がD-ソルビトールを2KLGAに変換する能力を有するものである上記（１５）または（１６）の形質転換体。

（１８）上記（１３）の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から上記（１）～（５）および（１０）のいずれかのSLDH活性を有する蛋白質を採取することを含む該蛋白質の製造方法。

（１９）上記（１３）の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含むL-ソルボースの製造方法。

（２０）SDHをコードするDNAおよびSNDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に上記（１９）の方法により得られるL-ソルボースを接触させる工程を含む2KLGAの製造方法。

（２１）上記（１７）の形質転換体を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含む2KLGAの製造方法。

（２２）上記（２０）または（２１）の方法により得られる2KLGAを、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩に変換する工程を含む、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩の製造方法。

本発明のSLDH遺伝子を発現する組換え細胞は、L-ソルボースおよび2KLGAの発酵生産のための有用な手段となり得る。したがって、本発明はL-アスコルビン酸を簡単且つ大量に製造する上で極めて有用でなる。

#### 図面の簡単な説明

第１図は、L-アスコルビン酸合成の反応スキームを示す図である。図中、R

はアルキル基を表す。

第2図は、プラスミドpUCP19-B7SX2およびpUCP19-HCのDNAインサート部分の制限酵素地図、並びにpUCP19-HCのDNAインサート部分のシーケンス・ストラテジーを示す図である。

第3図は、プラスミドpUCP19-SLDHの遺伝子地図を示す図である。

第4図は、発現ベクターpSDH-tufB1-Eco-d9Uの遺伝子地図を示す図である。

第5図は、発現ベクターpBBR(Km)-SDH-SNDHの遺伝子地図を示す図である。

第6図は、発現ベクターpBBR(Tc)-SDH-SNDHの遺伝子地図を示す図である。

第7図は、発現ベクターpUCP19-SDH-SNDHの遺伝子地図を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明のSLDHは、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する、分子量約54kDaの蛋白質であり、補酵素としてNADP<sup>+</sup>またはNAD<sup>+</sup>を要求することを特徴とする。本酵素はソルビトールの他、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化することができるが、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールには作用しない。

本発明のSLDHは、上記の特徴を有する限りその由来に特に制限はなく、天然に存在する生物起源のもの他、自然もしくは人工の突然変異体、あるいは異種、すなわち外来のSLDH遺伝子を導入して得られる形質転換体由来のものもすべて包含される。好ましくは酢酸菌、特にグルコノバクター属に属する細菌、より好ましくはグルコノバクター・オキシダンス、就中グルコノバクター・オキシダンスG624株(FERM BP-4415; 国際特許出願公開WO95/



23220号公報)由来のSLDHが例示される。また、別の好ましい態様においては、本発明のSLDHは、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと分子進化上、同一の遺伝子を起源とするSLDHである。ここで、「分子進化上、同一の遺伝子を起源とする」とは、そのDNA配列分析、生理学的役割等の解析により、分子進化上、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと同一の遺伝子を起源として進化してきたと合理的に判断されるSLDHをいい、これらはDNA配列上、高度な相同性を保持している。これらのSLDHは、好ましくは、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと、DNA配列において60%以上、最も好ましくは80%以上の相同性を示すものである。これらは、後で詳述するように、配列表配列番号2に示されるDNA配列をもとに、適当なプライマーを用いてPCR法により、あるいは適当なプローブを用いてハイブリダイゼーション法によりその遺伝子をクローニングすることができる。

さらに好ましい態様においては、本発明のSLDHは配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、またはSLDH活性を損なわない範囲で、該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質である。

本発明のSLDHは、(1) 該酵素を産生する細胞または組織の培養物を原料として単離精製する方法、(2) 化学的に合成する方法または(3) 遺伝子組換え技術によりSLDHを発現するように操作された細胞から精製する方法等を適宜用いることによって取得することができる。

天然のSLDH産生細胞からのSLDHの単離精製は、例えば以下のようにして行うことができる。すなわち、適当な液体培地中で該細胞を培養し、得られる培養物からSLDH活性を含む画分を分離回収する。例えば、該酵素が細胞質に局在する場合(本発明のSLDHはNAD(P)<sup>+</sup>依存性であることから、細胞質に局在することが予測される)、培養物を遠心および/または濾過して菌体を回収後、超音波処理やリゾチーム処理および浸透圧ショック等により該菌体を破碎

し、10,000～40,000rpm程度で遠心して上清（可溶性画分）を回収する。目的のSLDHは、得られた可溶性画分から、酵素蛋白質の分離精製に常套的に利用されている分離技術を適宜組み合わせることによって精製することができる。このような分離技術としては、例えば、塩析、溶媒沈澱法等の溶解度の差を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）、SDS-PAGE等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー等の荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性を利用する方法、等電点電気泳動等の等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

化学合成による本発明のSLDHの製造は、例えば配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列を基にして、各配列の全部または一部をペプチド合成機を用いて合成し、得られるポリペプチドを適当な再生条件下で再生（renaturation）させることにより行うことができる。

しかしながら、本発明の一実施態様であるG. オキシダンスG624由来のSLDHは、非生理学的な条件において非常に不安定な酵素であるため、上記の方法では精製の途中で酵素が失活する場合がある。このような酵素は、ヒスチジントグ法、GST法等の、特定物質にアフィニティーのある付加・改変配列を利用したアフィニティークロマトグラフィーで素早く精製することができる。したがって、本発明のSLDHの特に好ましい取得方法は、以下に詳述するように、該酵素を有する細胞のDNAから該酵素をコードするDNAをクローニングし、さらに遺伝子操作により、金属イオンキレートに吸着し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列を該DNAに付加する工程を含むものである。

酵素遺伝子のクローニングは、通常、以下の方法により行われる。まず、所望の酵素を産生する細胞または組織より、該酵素を上記のような手段により完全または部分精製し、N末端アミノ酸配列をエドマン法により決定する。また、該酵

素を配列特異的プロテアーゼで部分分解して得られるオリゴペプチドのアミノ酸配列を同様にエドマン法により決定する。決定された部分アミノ酸配列に対応する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーまたはプローブとして用いて、該酵素を産生する細胞または組織より調製されたRNAまたはDNAからPCR法またはコロニー（もしくはブランク）ハイブリダイゼーション法によって該酵素をコードするDNAをクローニングする。

あるいは、完全または部分精製された酵素の全部または一部を抗原として該酵素に対する抗体を常法にしたがって作製し、該酵素を産生する細胞または組織より調製されたcDNAまたはゲノミックDNAライブラリーから、抗体スクリーニングにより該酵素をコードするDNAをクローニングすることもできる。

しかしながら、上記のG. オキシダンスG 6 2 4由来SLDHのように、不安定で精製が困難な酵素については、その酵素活性をマーカーとして、ゲノミックDNAライブラリーから該酵素の遺伝子をそのプロモーター配列を含む断片としてスクリーニングすることができる。SLDHは、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換するので、生成するL-ソルボースを検出することによりSLDH活性を有するクローンを選択することができる。なお、本法の適用にあたっては、技術的困難を伴う場合が多い。

具体的には、まずSLDH活性を有する細胞または組織から染色体DNAを常法により単離し、これを適当な制限酵素で分解して、好ましくは染色体DNA内に多数の制限部位を有する制限酵素で部分分解して、得られる断片を適当なクローニングベクター中に挿入する。クローニングベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター等が挙げられるが、大きなDNAインサートを収容できて、且つコロニーとして回収できることから、コスミドベクターやシャロミドベクターが好ましい。ファージベクターやコスミドベクター等を用いる場合は、さらにインビトロパッケージングを行って、ゲノミックDNAライブラリーを得る。

コスミドライブラリーを用いる場合は、上記のようにして得られるパッケージング液で適当な指示菌、好ましくは高形質転換能を有する大腸菌コンピテント細胞を感染させた後、固形培地上にプレートして培養する。生じた各コロニーを個別にD-ソルビトールを含む液体培地に植菌して培養する。培養終了後、培養上清を回収して、例えば、レゾルシン-塩酸反応 (Cohen, *J. Biol. Chem.*, 201, 71, 1953)、レゾルシン-第二鉄塩-塩酸反応 (Kulka, *Biochem. J.*, 63, 542, 1956) のようなケトヘキソースの呈色反応を用いてSLDH活性を有するクローンの候補を選択する。

得られたクローンが実際にSLDH活性を有する（すなわち、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する）ことは、例えば、HPLC等により培養上清中のソルボースを検出することにより確認される。

コスミドクローンのDNAインサートは35～45 kbと非常に大きいので、プラスミドへのサブクローニングを容易にするために、予めインサートDNAの非SLDH遺伝子領域の一部を除いて縮小化するのが望ましい。このようなDNAインサートの縮小化方法としては、例えばシャロミドベクター等へのサブクローニングが挙げられる。シャロミドベクターは種々の長さのスペーサーDNAを有するので、コスミドベクターよりも小さな種々の長さのDNAをクローニングできる。本発明においては、例えば、約10～20 kbのDNAインサートを収容し得るシャロミドベクターが好ましく使用される。SLDH活性を有するシャロミドクローンは上述の方法により選択することができる。

プラスミドベクターへのサブクローニングは、例えば、上記のようにして得られる複数のシャロミドクローンについて制限酵素マッピングを行い、SLDH遺伝子内に制限部位が存在しないことがわかった制限酵素を用いてDNAインサートをさらに縮小化し、同様に制限酵素処理したプラスミドベクターとライゲーションさせることにより行うことができる。

上記のストラテジーとは別に、本発明のSLDHをコードするDNAは、PC

R法を用いて直接クローニングすることもできる。すなわち、該酵素活性を有する細胞または組織由来のゲノミックDNAまたはcDNA（もしくはmRNA）を鋳型とし、増幅断片がSLDHのコード領域をカバーするような適当なオリゴヌクレオチドの対をプライマーとして用いて、常法に従ってPCRを行うことにより、SLDHのコード領域を含むDNA断片を増幅することができる。このような方法は、配列既知のSLDHと分子進化上、同一の起源を有するSLDH遺伝子のクローニングにおいて特に有用である。例えば、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと分子進化上、同一の起源を有すると推定される他の細菌由来のSLDH遺伝子をクローニングする場合、配列表配列番号2に示されるDNA配列に基づいて、該配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列を含むDNA断片と高度に相同性を有するDNA断片を増幅し得るようなセンスおよびアンチセンスプライマーを構築してPCR法を実施すればよい。一方、目的のSLDHと高度な相同性を有するSLDHのDNA配列が未知の場合でも、例えば、5'上流領域の比較的保存されている幾つかの配列をセンスプライマー、3'下流領域の比較的保存されている幾つかの相補鎖配列をアンチセンスプライマーとして、PCRを行うことにより、該SLDH遺伝子をクローニングすることができる。SLDHの上下流配列が未知の場合、鋳型DNAと使用するプライマーとがある程度のミスマッチを含んでいても結合可能な程度に、アニーリング温度を低く設定する必要がある。したがって、PCR産物は目的のSLDH遺伝子を含む断片の他に、非特異的な増幅断片を含んだ混合物となる可能性がある。この場合、得られた増幅断片を、適当なクローニングベクター（例えば、TAクローニング用のプラスミドベクター等）、あるいは目的の増幅断片がプロモーター領域を含まない場合は、発現ベクターにクローニングし、これで大腸菌などのコンピテント細胞を形質転換して、上述の方法によりSLDH活性を有する形質転換体をスクリーニングすればよい。

配列既知のSLDHと分子進化上、同一の起源を有するSLDH遺伝子のクロ

ーニングにおいては、さらに別のストラテジーとして、SLDH活性を有する細胞または組織由来のゲノミックDNAまたはcDNA（もしくはmRNA）を鋳型とし、既知DNA配列の全部または一部をプローブとして用いて、サザン法等のハイブリダイゼーション法により、直接クローニングする方法が挙げられる。ハイブリダイゼーションの条件は、DNAの由来により、ストリンジェンシーを適宜変化させて用いることができる。例えば、クローニングしようとする微生物の近縁度合い等から、その条件を、塩基配列において約60%以上の相同性を有する配列のみがハイブリッドを形成する条件、また、約80%以上の相同性を有する配列のみがハイブリッドを形成する条件などに、適宜変化させて用いることができる。

上記のようにして得られたDNAインサートの塩基配列は、マキサム・ギルバート法やジデオキシターミネーション法等の公知のシーケンス技術を用いて決定することができる。

本発明のSLDHをコードするDNAは、好ましくは、配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列（但し、該変異アミノ酸配列からなる蛋白質がD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒し得る）をコードするDNAである。さらに好ましくは、本発明のSLDHをコードするDNAは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列から実質的になるDNAである。ここで、「実質的になるDNA」とは、該特定塩基配列からなるDNAに加えて、該特定塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る塩基配列からなり、且つ該特定塩基配列からなるDNAがコードする蛋白質と同様の理化学的性質を有する蛋白質をコードするDNAを意味する。また、ここで「ストリンジェントな条件」とは、塩基配列において約60%以上の相同性を有するDNAがハイブリダイズし得る条件をいう。ストリンジェンシーは、ハイブリダイズ反応や洗浄

の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができる。

また、別の本発明のDNAは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列およびその部分DNAとハイブリダイズし得る塩基配列からなり、且つSLDH活性を有する蛋白質をコードする遺伝子をも包含する。したがって、該遺伝子によってコードされるSLDH活性を有する蛋白質、特にグルコノバクター属由来である蛋白質もまた、本発明の範囲に包含される。

本発明のDNAは、上記のようにしてゲノミックDNAから得られるDNAだけでなく、mRNAから得られるcDNAであっても、あるいは配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列を基にして、化学的に合成されるDNAであってもよい。

上記のようにSLDH活性を指標としてゲノミックDNAから得られた、SLDHをコードするDNAは、その5'上流領域にプロモーター遺伝子配列を含んでいる。該プロモーター遺伝子は、好ましくは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号1～536で示される塩基配列、または該塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも1種の微生物においてプロモーター活性を有するDNAである。ここで「微生物」としては、細菌（例えば大腸菌、枯草菌、シュードモナス、グルコノバクター、シュードグルコノバクター、アセトバクター等）および放線菌などの原核生物、並びに酵母等の一部の真核生物が好ましく例示される。

本発明はまた、本発明のSLDHをコードするDNAを含む組換えベクターを提供する。本発明の組換えベクターは、原核および／または真核細胞の各種宿主細胞内で複製保持または自律増殖できるものであれば特に限定されず、プラスミドベクターおよびファージベクター等が包含される。当該組換えベクターは、簡便には当該分野において入手可能なクローニングベクターまたは発現ベクターに、SLDHをコードするDNAを適当な制限酵素部位を利用して挿入することによ

って調製することができる。

特に、本発明の組換えベクターは、ある宿主細胞内で機能的なプロモーターの制御下にSLDHをコードするDNAが配置された発現ベクターである。使用されるベクターとしては、原核および／または真核細胞の各種宿主細胞内で機能して、その下流に配置された遺伝子の転写を制御し得るプロモーター領域と、該遺伝子の転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有し、該プロモーター領域と該ターミネーター領域とが少なくとも1つの制限酵素認識部位、好ましくはユニークな制限部位を含む配列を介して連結されたものであれば特に制限はないが、形質転換体選択のための選択マーカー遺伝子をさらに含有していることが好ましい。さらに所望により、該発現ベクターは、開始コドンおよび終止コドンを、それぞれプロモーター領域の下流およびターミネーター領域の上流に含んでいてもよい。

宿主細胞として細菌を用いる場合、一般に発現ベクターは上記のプロモーター領域およびターミネーター領域に加えて、宿主細胞内で自律複製し得る複製可能単位を含む必要がある。プロモーター領域には、プロモーター、オペレーターおよびShine-Dalgarno(SD)配列が含まれる。例えば、宿主が大腸菌の場合には、プロモーター領域としてtrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーター等が、また、宿主が枯草菌の場合には、プロモーター領域としてSPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等が挙げられる。ターミネーター領域としては、通常使用されている天然または合成のターミネーターを用いることができる。また、選択マーカー遺伝子としては、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン等の各種薬剤に対する耐性遺伝子を用いることができる。開始コドンとしては通常ATGが用いられるが、場合によってGTGを使用することもできる。終止コドンとしては常用のTGA、TAAおよびTAGが用いられる。

本発明のSLDHをコードするDNAが該酵素を産生する細胞または組織由来



のゲノミックDNAから調製され、本来のプロモーターおよびターミネーター領域を含有する形態で得られる場合には、本発明の発現ベクターは、形質転換しようとする宿主細胞内で複製保持または自律増殖できる公知のクローニングベクターの適当な部位に該DNAを挿入することによって調製することができる。用いられるクローニングベクターとしては、宿主が細菌の場合、大腸菌由来のpBR系ベクター、pUC系ベクター等、あるいは枯草菌由来のpUB110、pTP5、pC194等が例示される。

本発明のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターが、組換えSLDHの製造のために使用される場合、特に該SLDHが非常に不安定で、通常の精製法では精製途中で酵素が失活する可能性がある場合には、以下のような改変SLDHコーディング配列を含む発現ベクターを用いることが特に好ましい。該改変SLDHコーディング配列は、本来のSLDHアミノ酸配列の末端にSLDHの精製を迅速化し得る特定のアミノ酸配列が付加された形態で、SLDHが発現するように、本来のSLDHコーディング配列の末端に該特定アミノ酸配列をコードする塩基配列が付加された配列からなる。SLDHの精製を迅速化し得る特定のアミノ酸配列としては、金属イオンキレートに吸着し得るアミノ酸配列、好ましくはヒスチジン、リジン、アルギニン等の塩基性アミノ酸からなる配列、より好ましくはヒスチジンからなる配列が挙げられる。このような配列はSLDHのアミノ末端またはカルボキシル末端に付加することができるが、カルボキシル末端に付加するのがより好ましい。このような改変SLDHコーディング配列は、本来のSLDHコーディング配列の末端配列と一致する塩基配列に、付加すべきアミノ酸配列をコードする塩基配列を付加してなるオリゴヌクレオチドを合成し、これを一方のプライマーとして用い、SLDH DNAを鋳型としてPCRを行うことにより構築することができる。結果として得られる組換えSLDHは、以下に詳述するように、付加されたアミノ酸配列を吸着させ得る金属イオンキレートを固定化した担体を用いて迅速に単離精製することができる。

また、本発明のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターが、2KLGAの製造のために使用される場合には、当該DNAに加えて、SDHおよび／またはSNDHをコードするDNAを、宿主細胞内で発現し得る形態で含有する発現ベクターを用いることもできる。SLDHをコードするDNA、SDHをコードするDNAおよびSNDHをコードするDNAは、それぞれ別のプロモーターの制御下に置かれてもよく、あるいはそのうちの2つ以上が同一のプロモーターの制御下にタンデムに配置してもよい。

本発明の形質転換体は、本発明のSLDHをコードするDNAを含有する組換えベクターで宿主細胞を形質転換することにより調製することができる。宿主細胞は使用する組換えベクターに適合し、形質転換され得るものであれば特に限定されず、当分野で通常使用される天然に存在する細胞あるいは人工的に作製された変異体細胞もしくは組換え体細胞など種々の細胞が利用できる。好ましくは細菌、特に大腸菌（例えばDH5α、HB101等）、枯草菌、シュードモナス属細菌（例えばシュードモナス・フルオレセンス等）、グルコノバクター属細菌（例えばグルコノバクター・オキシダンス等）、シュードグルコノバクター属細菌、アセトバクター属細菌等である。

組換えベクターの宿主細胞への導入は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、宿主が大腸菌や枯草菌等の細菌の場合には、Cohen らの方法[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110 (1972)]、プロトプラスト法[*Mol. Gen. Genet.*, 168: 111 (1979)]、コンピテント法[*J. Mol. Biol.*, 56: 209 (1971)]、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

特に、本発明の形質転換体は、本発明のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞である。該形質転換体がD-ソルビトールから2KLGAを製造することを目的として作製される場合、宿主細胞はL-ソルボースを2KLGAに変換する能力を有するものである必要がある。好ましくは、該宿主細胞はSDHおよびSNDH活性を産生する細胞である。天然に存在

するこのような細胞としては、例えばグルコノバクター属やアセトバクター属、シュードグルコノバクター属等に属する細菌、具体的にはグルコノバクター・オキシダンス T-100 (FERM BP-4415; 国際特許出願公開WO 95/23220号公報) 等が挙げられる。また、人工的に作製されたこのような細胞としては、上記の天然に存在する細菌等から単離されたSDHおよびSNDHをコードするDNAを機能的に含む発現ベクターで形質転換された細胞、好ましくは大腸菌、シュードモナス属細菌、グルコノバクター属細菌、シュードグルコノバクター属細菌、アセトバクター属細菌等が挙げられる。具体的には、*E. coli* JM109-pUC19SD5 (国際特許出願公開WO 94/20609号公報), グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-tufB1, グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-trp6, グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-PL1, グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-tac8 (以上、国際特許出願公開WO 95/23220号公報) 等が例示される。

また、本発明の形質転換体は、上記のようにSLDHをコードするDNAに加えて、SDHをコードするDNAおよび/またはSNDHをコードするDNAを、宿主細胞内で発現し得る形態で含有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによっても得ることができる。該発現ベクターがSDHをコードするDNAまたはSNDHをコードするDNAのいずれか一方を欠く場合、当該DNAを含む別の発現ベクターとともにコ・トランスフォーメーションすればよい。

本発明の組換えSLDHは、上記のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物からSLDHを採取することにより製造することができる。

用いられる栄養培地としては、炭素源としてグルコース、フルクトースなどの糖類、グリセロール、好ましくはL-ソルボース、D-ソルビトールを含有するものである。また無機もしくは有機窒素源 (例えば硫酸アンモニウム, 塩化アンモニウム, カゼインの加水分解物, 酵母抽出物, ポリペプトン, バクトトリプト

ン、ビーフ抽出物等)を含んでいてもよい。さらに所望により、他の栄養源〔例えば、無機塩(例えば、ニリン酸ナトリウムまたはニリン酸カリウム、リン酸水素二カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム)、ビタミン類(例えば、ビタミンB<sub>1</sub>)、抗生物質(例えば、アンピシリン、カナマイシン)など〕を培地中に添加してもよい。好ましくは、D-ソルビトール、酵母エキス、CaCO<sub>3</sub>、グリセロールを組成とする培地である。また、培地の糖(D-ソルビトール)の濃度は、通常1~50%、好ましくは2~40%である。

形質転換体の培養は、通常pH5.5~8.5、好適にはpH6~8の条件下、通常18~40℃、好適には20~35℃で5~150時間で行われる。

SLDHの精製は、SLDH活性の存在する画分に応じて、通常使用される種々の分離技術を適宜組み合わせることにより行うことができる。本発明のSLDHはNAD(P)<sup>+</sup>依存性であることから、通常、形質転換体の可溶性画分に局在する可能性が高い。その場合、培養終了後に培養物を濾過もしくは遠心分離して菌体を回収し、超音波処理やリゾチーム処理および浸透圧ショック等によって細胞を破碎して得られる菌体抽出液を用いる。

組換えSLDHが、上述のようにその末端に特定のアミノ酸配列を付加された形態で産生される場合、該SLDHは、該特定アミノ酸配列を吸着させ得る金属イオンキレートを固定化した担体を用いたクロマトグラフィー処理(固定化金属アフィニティークロマトグラフィー; IMAC)により、迅速且つ容易に精製することができる。使用される金属イオンキレート吸着体は、遷移金属、例えばコバルト、銅、ニッケル、鉄の二価イオン、あるいは鉄、アルミニウムの三価イオン等、好ましくはコバルトの二価イオン含有溶液を、リガンド、例えばイミノジ酢酸基、ニトリロトリ酢酸基、トリス(カルボキシメチル)エチレンジアミン基等を付着したマトリックスと接触させて該リガンドに結合させることにより調製される。キレート吸着体のマトリックス部は通常の不溶性担体であれば特に限定されない。

本発明のＬ－ソルボースの製造方法は、上記のＳＬＤＨをコードするＤＮＡを含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物、あるいはＳＬＤＨ活性が該形質転換体の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液にＤ－ソルビトールを接触させることにより、Ｌ－ソルボースを生成させる。培養物にＤ－ソルビトールを接触させる方法には、Ｄ－ソルビトールを含有する培地中で該形質転換体を培養する方法も包含される。

本発明はまた、上記方法により取得されたＬ－ソルボースを利用した２ＫＬＧＡの製造方法を提供する。すなわち、Ｌ－ソルボースを２ＫＬＧＡに変換し得る宿主細胞、好ましくはＳＤＨをコードするＤＮＡおよびＳＮＤＨをコードするＤＮＡを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、適当な培地中で培養し、得られる培養液、あるいはＳＤＨおよびＳＮＤＨ活性が該宿主細胞の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液に上記方法により取得されたＬ－ソルボースを接触させることにより、２ＫＬＧＡを生成させる。培養物にＬ－ソルボースを接触させる方法には、Ｌ－ソルボースを含有する培地中で該宿主細胞を培養する方法も包含される。

本発明の別の２ＫＬＧＡの製造方法は、上記のＳＬＤＨをコードするＤＮＡを含む発現ベクターで形質転換された、Ｌ－ソルボースを２ＫＬＧＡに変換し得る宿主細胞を、適当な培地中で培養し、得られる培養液、あるいはＳＬＤＨ、ＳＤＨおよびＳＮＤＨ活性が該宿主細胞の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液にＤ－ソルビトールを接触させることにより、２ＫＬＧＡを生成させる。培養物にＤ－ソルビトールを接触させる方法には、Ｄ－ソルビトールを含有する培地中で該宿主細胞を培養する方法も包含される。

本発明のＬ－ソルボースの製造方法および２ＫＬＧＡの製造方法において用いられる培地および培養条件は、上記のＳＬＤＨの製造方法において用いられるものと同一であるかもしくは一部が異なるものでよい。

また、菌体抽出液にＤ－ソルビトールまたはＬ－ソルボースを接触させる場合

には、培養終了後の培養物を遠心分離または濾過して菌体を回収し、これを適当な緩衝液、例えば酢酸緩衝液中に懸濁して、超音波処理等により菌体を破碎した後遠心処理して得られる上清を菌体抽出液として使用すればよい。

このようにして生産されたL-ソルボースまたは2 K L G Aは、反応液（D-ソルビトールまたはL-ソルボースを含有する培地中で該形質転換体を培養する場合には培養上清）から一般に用いられる精製方法（例えば、透析、ゲル濾過、適当な吸着材上でのカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなど）を用いて精製することができる。

精製された2 K L G Aは、従来公知の手段により、L-アスコルビン酸またはその塩（例えば、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属との塩）に変換することができる。このような手段は特に限定されないが、例えば、2 K L G Aに塩酸などの強酸を加えて加熱する方法が挙げられる。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、これらは単なる例示であって、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

#### 実施例1 SLDHのクローニング

##### （1）染色体DNAの調製

G. オキシダンス G 6 2 4 株（FERM BP-4 4 1 5；国際特許出願公開 WO 9 5 / 2 3 2 2 0 号公報）のシングルコロニーを2.5%マンニトール、0.3%ポリペプトンおよび0.5%酵母エキスカラなる培地（pH 6.0）で37℃、48時間培養した。菌体を遠心（6,000 rpm, 10分間）により集めて、滅菌水1mlに懸濁した。懸濁液をSTE緩衝液〔20%スクロース-50mM Tris-HCl（pH 8.0）-1mM EDTA〕1mlで希釈し、リゾチーム2mgを加えた後、37℃で30分間放置した。これに、サルコシル溶液〔1%ラウロイルサルコシレート-100mM EDTA（pH 8.5）〕2.5mlとプロテイナーゼK（終濃度100μg/ml）を加え、50℃で2時間放置した。

これにセシウムクロライド5.5 gおよび5 mg/mlエチジウムブロミド0.3 mlを加え、20℃、50,000 rpmで16時間超遠心した。染色体DNAを含む部分を単離し、TE緩衝液〔10 mM Tris-HCl (pH 8.0) - 1 mM EDTA〕30 mlで溶解した後、5 Lの1 mM EDTAで2回透析した。透析液をイソブタノールで4回、フェノールで2回、クロロフォルムで3回洗浄した後、エタノール沈澱により精製した。これをTE緩衝液10 mlで溶解し、180  $\mu$ g/mlの染色体DNA溶液を得た。

## (2) コスミドライブラリーの作製

大腸菌DH1/pcos6 EMBL (ATCC 37571; 住友ファーマ・インターナショナル (株) 経由でATCCより購入) のシングルコロニーを50  $\mu$ g/mlカナマイシン含有LB培地〔1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1%塩化ナトリウム (pH 7.4)〕3 ml中で37℃、16時間培養した後、その0.5 mlを50  $\mu$ g/mlカナマイシン含有LB培地50 mlを入れた500 ml容三角フラスコに植菌した。37℃で8時間培養した後、遠心 (6,000 rpm, 10分間) により集菌し、QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社) でコスミドpcos6 EMBLを精製した。pcos6 EMBL 25  $\mu$ gを50 UのBamHIで37℃、2時間消化後、エタノール沈澱により精製した。これを3 Uの仔ウシ小腸由来アルカリフォスファターゼ (CIAP) で37℃、1時間脱リン酸処理し、エタノール沈澱により精製した。一方、上記(1)で得られたG. オキシダンスG624株の染色体DNA 100  $\mu$ gを5 UのSau3AIで37℃、1分間部分消化後、エタノール沈澱により精製した。該部分消化物約1.5  $\mu$ gとpcos6 EMBLのBamHI消化物約3  $\mu$ gを、3 UのT4 DNAリガーゼで4℃、16時間ライゲーションした。このうち3  $\mu$ lをGIGAPACK II Gold Packaging Extract (STRATAGENE 社) でインビトロパッケージングした。このパッケージング液をSMバッファー〔50 mM Tris-HCl (pH 7.5) - 100 mM NaCl - 8 mM MgSO<sub>4</sub> - 0.1%ゼラチン〕で50

倍希釈し、その25  $\mu$ lで指示菌（大腸菌XL1-Blue MRA）25  $\mu$ lを感染させた後、50  $\mu$ g/mlカナマイシン含有LBプレートに播き、37°Cで1晩放置した。約400個のコロニーが得られたので、約40万クローンのコスミドライブラリーが得られたことになる。

### （3）SLDH活性を有するクローンのスクリーニング

5%ソルビトールおよび50  $\mu$ g/mlカナマイシンを含有する0.9倍希釈LB培地を1ウェルあたり150  $\mu$ l入れた96ウェルプレート丸底（ナルジェ社）で、368個のコスミドクローンを30°C、3日間ゆるやかに振盪培養した。遠心（2,000 rpm, 10分間）後、培養上清20  $\mu$ lに0.5 mg/ml レゾルシン-エタノール溶液30  $\mu$ lと0.216 mg/ml硫酸鉄(III) アンモニウム-塩酸溶液30  $\mu$ lを加えた後、80°Cで1時間加熱した。培地のみを同様に反応させたものをコントロールとし、コントロールよりも強く褐色を呈した1A4、1A5、4A9の3クローンをソルボース（フラクトース）への変換能を有するクローンとして選択した。これらの培養上清をHPLC〔カラム：Polyspher OA KC（E. メルク社）、7.8×300 mm；温度：室温；移動相：0.01 N  $H_2SO_4$ ；流量：0.4 ml/分；検出：RI〕で分析したところ、いずれのクローンもソルボースが検出されたので、これら3クローンをSLDH活性を有するクローンとした。これらコスミドクローンのインサート部分の長さはいずれも約40 kbであった。

### （4）シャロミドベクターへのサブクローニング（インサートの縮小化）

SLDH活性を有する300 ngのコスミドクローン1A4を、20 mUのSau3AIで37°C、1時間部分消化した。また、シャロミド9-28（ニッポンジーン社）1  $\mu$ gを4 UのBamHIで37°C、1時間消化した。この2つの溶液を混合後、エタノール沈澱により精製し、2倍希釈したTE緩衝液5  $\mu$ lで溶解したものを、1 UのT4DNAリガーゼで4°C、16時間ライゲーションした。このうち1  $\mu$ lをGIGAPACK II XL Packaging Extract（STRATAGENE社）でイ



ンビトロパッケージングした。このパッケージング液 $75\mu\text{l}$ とSMバッファ $75\mu\text{l}$ を混合し、これで指示菌(大腸菌DH-1) $150\mu\text{l}$ を感染させた後、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン含有LBプレートに播き、 $37^\circ\text{C}$ で1日インキュベートした。出現したコロニーのうち95個を、5%ソルビトールおよび $50\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンを含有する0.9倍希釈LB培地を1ウェルあたり $150\mu\text{l}$ 入れた96ウェルプレート丸底(ナルジェ社)で、 $30^\circ\text{C}$ 、3日間ゆるやかに振盪培養した。遠心( $2,000\text{rpm}$ , 10分間)後、培養上清 $20\mu\text{l}$ に $0.5\text{mg}/\text{ml}$ レゾルシン-エタノール溶液 $30\mu\text{l}$ と $0.216\text{mg}/\text{ml}$ 硫酸鉄(III)アンモニウム-塩酸溶液 $30\mu\text{l}$ を加えた後、 $80^\circ\text{C}$ で1時間加熱した。培地のみを同様に反応させたものをコントロールとし、コントロールより強く褐色を呈したG1、C2、A4、B7、H10、B12の6クローンをソルボースへの変換能を有するクローンとした。これらのシャロミドクローンのインサート部分の長さはいずれも約 $15\text{kb}$ であった。

#### (5) SLDH遺伝子のプラスミドベクターへのサブクローニング

これまでに得られたクローンの制限酵素地図から、SLDH遺伝子にはSac I部位およびXba I部位が存在しないことがわかった。そこで、 $1\mu\text{g}$ のシャロミドB7を10UのSac Iおよび10UのXba Iで消化し、約 $6\text{kb}$ (B7SX3)と約 $9\text{kb}$ (B7SX2)のSac I-Xba I断片を得た。この2つの断片をそれぞれ大腸菌-シュードモナスシャトルベクターpUCP19[pUC19のNar I部位に、pRO1614由来の $1.8\text{kb}$ のPst I断片が挿入されており、大腸菌DH5 $\alpha$ F'(ATCC 87110)から精製した]に連結した後、シュードモナス(*Pseudomonas*) (その後、本菌株はシュードモナス sp. F-1と命名された。以下、本命名を用いる。)をエレクトロポレーション法にて形質転換し、Ps./pUCP19-B7SX3とPs./pUCP19-B7SX2を得た。コンピテント細胞の調製および形質転換の条件は大腸菌のそれに準じて行った。この2クローンをソルビトールを含む培地で培養したと

ころ、Ps./pUCP19-B7SX2にソルボースへの変換能が認められた。そこで、Ps./pUCP19-B7SX2を、5%ソルビトール、1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%塩化ナトリウム、50  $\mu$ g/mlアンピシリンからなる培地 (pH 7.4) で30°C、4日間培養したところ、2.4 mg/mlのソルボースが得られた (変換率5%)。このソルボースをHPLCで分取し、標品との保持時間の一致を確認した。HPLCは上記 (3) と同様の条件にて行った。さらに、GC/MS [カラム: DB-5 (J & W Scientific), 0.32 mm $\times$ 30 m (film 0.25  $\mu$ m); 温度: インジェクション=230°C, カラム=100°C (5分)  $\rightarrow$  10°C/分で10分間加温 $\rightarrow$  200°C (5分)  $\rightarrow$  30°C/分で1分間加温 $\rightarrow$  230°C (4分), 検出=230°C; 流量: 圧力制御20 kPa (He)] を用いて、標品とのマスパターンの一致を確認した。

#### (6) SLDH遺伝子の塩基配列決定

SLDH活性を発現するシュードモナスの形質転換株Ps./pUCP19-B7SX2のプラスミドpUCP19-B7SX2のインサート部分の制限酵素地図は図2のように推定された。1  $\mu$ gのpUCP19-B7SX2を10 UのHind III で37°C、1時間消化して、約4 kbのHind III-Hind III断片を得た。このHind III-Hind III断片をベクターpUCP19に連結し、プラスミドpUCP19-HCを構築した。そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、Ps./pUCP19-HCを得た。この形質転換株をソルビトールを含む培地で培養したところ、SLDH活性の発現が認められたので、このHind III-Hind III断片にSLDH遺伝子の全長が含まれていることがわかった。従って、この約4 kbのHind III-Hind III断片の塩基配列を決定することにした。まず、pUCP19-HCのインサート部分を約1.1 kbのSph I-Sph I断片 (S1)、約0.8 kbのEcoRI-Sph I断片 (ES) および約1.3 kbのEcoRI-EcoRI (E1) 断片の3つに分け (図2)、それぞれpUC18にサブクローニングし、pUC

18-S1、pUC18-ESおよびpUC18-E1を得た。

プラスミドpUCP19-HC、pUC18-S1、pUC18-ESおよびpUC18-E1をテンプレートにして、M13シーケンシングプライマーであるユニバーサルプライマーおよびリバースプライマー（New England Labs.）を用いて最初のシーケンシングを行った。なお、サンプルは BigDye Terminator Cycle Sequencing kit（Applied Biosystems 社）で蛍光標識し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems 社）で分析した。次に、下に示した11種類のプライマーを合成し、pUCP19-HCをテンプレートにしてシーケンシングを行い、約4 kbのHind III-Hind III断片の塩基配列を決定した（配列表配列番号2）。

#### SLDH遺伝子シーケンス用プライマー

|      |                   |             |
|------|-------------------|-------------|
| SL1  | GCTGCTGAGTGATCCG  | （配列表配列番号3）  |
| SL2  | GACTGCTACTTCGATCC | （配列表配列番号4）  |
| SL3  | CCTACACCTAGCCTGC  | （配列表配列番号5）  |
| SL4  | CAGTGCCGTCATGAGG  | （配列表配列番号6）  |
| SL5  | TCCTGATCTCGGTGCG  | （配列表配列番号7）  |
| SL6  | GATGCTTCAGCACGGC  | （配列表配列番号8）  |
| SL7  | GACGATCACGGAAGGC  | （配列表配列番号9）  |
| SL8  | GGTTACGTGGTCGAGG  | （配列表配列番号10） |
| SL9  | CTATACGTGACAGGTCC | （配列表配列番号11） |
| SL10 | GCGCGATCTGGATACG  | （配列表配列番号12） |
| SL11 | CGAGGATCTCGAACGG  | （配列表配列番号13） |

塩基配列の解析から、1455 bpのORFが見出された（塩基番号537～1991）。したがって、SLDHは485アミノ酸からなり、分子量は約54 kDaであると推定された。また、ホモロジー検索の結果、シュードモナス・フルオレセンスのマニトールデヒドロゲナーゼと42%のホモロジーがあることが

わかった。

## 実施例2 組換えSLDHの製造

(1) ヒスチジン-T a gを有するSLDH (以下、His-tagged SLDH という) を発現するプラスミドの構築

組換え蛋白質を精製するのに、6×ヒスチジンを利用したT a gシステムは非常に簡便な方法である。すなわち、6つのヒスチジンT a gを持つ蛋白質を発現させ、コバルトやニッケルなどの金属とヒスチジン残基との相互作用を利用して、IMACにより該蛋白質を分離するというものである。まず、SLDHのC末端側に6×H i sを挿入するために、以下に示す2対のプライマーをそれぞれ用い、pUCP19-HC (5 n g) をテンプレートにして、p f u DNAポリメラーゼ (2.5 U) でPCRを行った (94℃, 30秒→55℃, 2分→72℃, 2分, 25サイクル)。なお、プライマー (各20 p m o l) は99℃で4分間加熱後、急冷したものを用いた。

### PCR1

プライマー1 (センス) [SLDHコーディング配列内のN h e I 部位 (下線部) 付近の配列と一致する配列]

CGGATTGCTAGCGATGGC (配列表配列番号14)

プライマー2 (アンチセンス) [SLDHコーディング配列の3'末端と一致する配列、6×H i s (H)、終止コドン (\*) およびB a m H I 部位 (下線部) を含む]

ATCGAGGATCC TCA ATGATGATGATGATGATG GGCCGGGATGGCGGC

\* H H H H H H (配列表配列番号15)

### PCR2

プライマー3 (センス) [B a m H I 部位 (下線部) およびSLDH遺伝子の終止コドンの直後の配列と一致する配列を含む]

ATCGAGGATCCATTCGGCTTTTAGGGTAGC (配列表配列番号 16)

プライマー4 (アンチセンス) [SLDH遺伝子の 3' 非コーディング領域内の Bgl II 部位付近の配列と一致する配列および Sac I 部位 (下線部) を含む]

TAGCTGAGCTCATGGGACAGATCTGAGC (配列表配列番号 17)

PCR 1 で特異的に増幅した約 360 bp の断片を Nhe I および BamHI で消化し、また、PCR 2 で特異的に増幅した約 100 bp の断片を BamHI および Sac I で消化した。これとは別に、pUCP19-HC を Bgl II および Pst I で消化して得られる約 2 kb の断片を、pUCP19 の BamHI-Pst I 断片に挿入してインサートの Bgl II 部位より下流を除いたプラスミド pUCP19-SLDH を得た (図 3)。これを Nhe I と Sac I で消化し、得られる約 6.2 kb の断片を、上記 2 つの PCR 増幅断片と T4 DNA リガーゼで連結し、pUCP19-SLDH-His を構築した。このプラスミドで *Shuttle* モナスを形質転換し、Ps. /pUCP19-SLDH-His を得た。

## (2) His-tagged SLDH の精製

形質転換株 Ps. /pUCP19-SLDH-His の凍結保存菌体の 1 白金耳を、50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 培地 2 ml を入れた 15 ml 容遠心チューブ (コーニング社) に植菌し、30°C で 16 時間培養した。その 1.5 ml を 5% ソルビトールと 50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 培地 50 ml を入れた 500 ml 容三角フラスコに植菌し、25°C で 3 日間培養した。遠心 (6,000 rpm、4°C、5 分間) により集菌した後、100 mM NaCl 含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 ml で懸濁した。該懸濁液を超音波破碎装置 (トミー社 UD-201 型) で 5 分間 (50% インターバル) 処理し、遠心 (15,000 rpm、4°C、10 分間) した後、上清を回収し無細胞抽出液とした。2 ml の TARON 樹脂 (CLONTECH 社) を 15 ml 容遠心チューブ (コーニング社) に入れ、100 mM NaCl 含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 ml で 2 回洗浄して平衡化した。そして、5 ml の上記無細胞抽

出液を加え、室温で20分間振盪することで His-tagged SLDH を吸着させた後、100mM NaCl含有20mM Tris-HCl (pH8.0) 10mlで3回、10分かけて洗浄した。次に、10mM、30mM、50mMおよび100mMイミダゾールをそれぞれ含有する100mM NaCl含有20mM Tris-HCl (pH8.0) 2mlを順次加え、それぞれ室温で2分間振盪して His-tagged SLDH を溶出した。その結果、30mM~50mMイミダゾール画分にSLDH活性が溶出した。該画分をSDS-PAGE分析したところ、ほぼ単一のバンドが検出された。

### (3) N末端アミノ酸配列分析

上記(2)で精製した His-tagged SLDH を、ゲル濃度12.5%のマルチゲル(第一化学薬品製)を用い、40mAの電流で1時間電気泳動した後、ホライズプロット(アトー社)を用いて、PVDF膜(イモビロンPSQ; ミリポア社)に転写した。膜をクマシーブリリアントブルーG-250で染色した後、約55kDaのSLDHと思われるバンドをハサミで切り出した。このPVDF膜をプロテインシークエンサーG100A(ヒューレットパッカード社)とPTHアナライザー1090型(ヒューレットパッカード社)でアミノ酸配列分析したところ、SLDH遺伝子のORFから予想されるN末端アミノ酸配列と一致する配列(MITRETLKSL; 配列表配列番号18)が得られた。

### (4) SLDH活性の確認

アブライする無細胞抽出液を10mlとすること、His-tagged SLDH 吸着後の樹脂の洗浄を6回行うこと、並びに50mMイミダゾールおよび100mM NaCl含有20mM Tris-HCl (pH8.0) 5mlで His-tagged SLDH を溶出させること以外は、上記(2)と同様にして His-tagged SLDH を精製した。次いで、得られた His-tagged SLDH をソルビトールと反応させた時の生成物を分析した。反応液(2ml)組成は、10mM (1.82mg/ml) ソルビトール、0.1Mグリシン/NaOH緩衝液(pH10.1)、5mM NADP<sup>+</sup>お

よび His-tagged SLDH 0.2 ml (41.4  $\mu$ g 蛋白) とし、25°Cで24時間反応させた。その結果、1.12 mg/ml のソルボースが生成した (ソルビトールは0.70 mg/ml 残存していた; 変換率62%)。したがって、コバルトタイプの IMA C で精製した His-tagged SLDH は、ソルビトールを酸化してソルボースを生成するソルビトール脱水素酵素であることが確認された。

### 実施例3 SLDHの特性解析

#### (1) 補酵素要求性および作用pH範囲

50 mM  $\text{NAD}^+$  (または  $\text{NADP}^+$ ) 0.1 ml、500 mM 緩衝液 0.2 ml、実施例2の(4)で調製した His-tagged SLDH 溶液 10  $\mu$ l (2.1  $\mu$ g 蛋白) および蒸留水 0.29 ml からなる溶液に、500 mM ソルビトール 0.4 ml を添加して反応を開始し (25°C)、 $\text{NADH}$  (または  $\text{NADPH}$ ) の増加を分光光度計 (UV-2200; 島津製作所) を用いて、340 nm における吸光度を指標として測定した。pH 10.1 および pH 9.0 の反応液はグリシン /  $\text{NaOH}$  緩衝液を、pH 8.0 および pH 7.0 の反応液はリン酸カリウム緩衝液をそれぞれ使用した。酵素活性 1 単位は 1 分間に 1  $\mu$ mol の  $\text{NADH}$  (または  $\text{NADPH}$ ) を生成する量と定義した。なお、 $\text{NAD(P)H}$  の分子吸光係数は  $6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  とした。また、蛋白量はウシ血清アルブミン (BSA) をスタンダードとして、ローリー法で測定した。その結果、SLDH は  $\text{NAD}^+$  および  $\text{NADP}^+$  のいずれも補酵素として利用できるが、 $\text{NADP}^+$  の方が特異性が高かった。また、該酵素の活性はアルカリ性の pH においてより高かった (表1)。

表 1

| 補酵素               | pH   | 活性 (U/mg 蛋白) |
|-------------------|------|--------------|
| NADP <sup>+</sup> | 10.1 | 130.2        |
|                   | 9.0  | 30.0         |
|                   | 8.0  | 22.9         |
|                   | 7.0  | 4.2          |
| NAD <sup>+</sup>  | 10.1 | 8.1          |
|                   | 9.0  | 3.4          |
|                   | 8.0  | 1.2          |
|                   | 7.0  | 0.1          |

## (2) 基質特異性

上記(1)の反応液において、ソルビトールを各種基質で置き換え、また緩衝液をグリシン／NaOH緩衝液(pH10.1)、補酵素をNADP<sup>+</sup>とする以外は全く同様にして、SLDH活性を測定した。その結果、本酵素はソルビトール  
の他、マンニトール、アラビトールを基質として利用できるが、キシリトール、  
リビトール、イノシトールおよびグリセロールには作用しなかった(表2)。



表 2

| 基質     | 活性 (U/mg 蛋白) |
|--------|--------------|
| ソルビトール | 130.2        |
| マンニトール | 85.7         |
| アラビトール | 88.1         |
| キシリトール | 0            |
| リビトール  | 0            |
| イノシトール | 0            |
| グリセロール | 0            |

### (3) ミカエリス定数

ソルビトールを基質として、上記(2)の方法に従ってSLDH活性を測定したところ、ソルビトールに対する $K_m$ 値は132mM(25℃)であった。

### 実施例4 SNDH/SDH発現ベクターを有するシュードモナス形質転換株の作製および該形質転換株による2KLGA生産性の検討

ルイジアナ州立大学メディカルセンターのKovach博士から供与された広域プラスミドであるpBBR系プラスミド[Gene, 166, 175 (1995)]のうち、pBBR1MCS-2(カナマイシン耐性)およびpBBR1MCS-3(テトラサイクリン耐性)をベクターとして用いて、シュードモナス属株にSNDH/SDH遺伝子を導入し、得られた形質転換体によるL-ソルボースからの2KLGAの発酵生産について検討した。

#### (1) SNDH/SDH発現広域プラスミドの構築

tufBをプロモーターとするSNDH/SDH遺伝子を含むプラスミドpSDH-tufB1-Eco-d9U(図4)5μgをEcoRI(ベーリンガー・マンハイム社)50Uで37℃、1時間消化し、0.8%アガロースゲルで電気

泳動した後、SNDH/SDH遺伝子を含む3.7 kbのEcoRI/EcoRI断片を分取した。この断片をpBBR1MCS-2のEcoRI部位に挿入した。そのうち、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子と同じ方向に挿入されたプラスミドをpBBR (Km) -SDH・SNDHとした(図5)。

また、tufBをプロモーターとするSNDH/SDH遺伝子を含むプラスミドpSDH-tufB1(構築方法は欧州特許出願公開公報EP 0758679 A1に記載) 10  $\mu$ g をEcoRI(ベーリンガー・マンハイム社) 50 Uで37°C、1時間消化した後、クレノウフラグメント(ニッポンジーン社)を用いて室温で30分間処理して末端を平滑化した。T4DNAリガーゼ(TOYOBO社)を用いて該末端にPstIリンカー(GCTGCAGC, TOYOBO社)を連結した後、PstI(ベーリンガー・マンハイム社) 50 Uで37°C、1時間消化した。該消化物を0.8%アガロースゲルで電気泳動して、SNDH/SDH遺伝子を含む3.7 kbのPstI/PstI断片を分取した。この断片をpBBR1MCS-3のPstI部位に挿入した。そのうち、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子と同じ方向に挿入されたプラスミドをpBBR (Tc) SDH・SNDHとした(図6)。

## (2) シュードモナスのコンピテント細胞の調製

シュードモナス sp. F-1のグリセロール凍結保存菌体を、1%バクトトリプトン(Difco社)、0.5%酵母エキス(Difco社)、1%塩化ナトリウムからなるL培地(pH7.4) 3 mlを含む16.5×165 mm試験管に接種し、30°Cで一晩培養した。その培養液全量をL培地50 mlを含む500 ml容三角フラスコに接種し、25°Cで6時間培養した。培養液を遠心して集菌した後、冷却した10%グリセロール水溶液30 mlで2回洗浄した。洗浄菌体を少量の冷却した10%グリセロール水溶液で懸濁し、60  $\mu$ lずつ分注した後、液体窒素で瞬間凍結した。

## (3) シュードモナスの形質転換

液体窒素中で凍結保存されたシュードモナス *sp.* F-1 のコンピテント細胞を氷水中で解凍した後、上記(1)で構築したSNDH/SDH発現広域プラスミド、pBBR(Km)-SDH・SNDHおよびpBBR(Tc)-SDH・SNDHの溶液それぞれ1 $\mu$ l(約1 $\mu$ g)を加え、4 $^{\circ}$ Cで30分間保持した。これをジーンバルサー遺伝子導入装置(バイオラッド社)を用い、電極間距離が0.1cmのキューベット中、200 $\Omega$ 、1.8kV、25 $\mu$ Fの条件でトランスフォームした後、0.4%グルコースを含むL培地に懸濁し、30 $^{\circ}$ Cで1時間振盪した。50 $\mu$ g/mlカナマイシンを含むL寒天プレートおよび20 $\mu$ g/mlテトラサイクリンを含むL寒天プレートにそれぞれ播き、30 $^{\circ}$ Cで2日間培養して、形質転換株Ps./pBBR(Km)-SDH・SNDHおよびPs./pBBR(Tc)-SDH・SNDHを取得した。

#### (4) 形質転換株によるソルボースからの2KLG Aの発酵生産

上記(3)で得られた形質転換株Ps./pBBR(Km)-SDH・SNDHおよびPs./pBBR(Tc)-SDH・SNDHのシングルコロニーを、5mlのL培地を含む16.5 $\times$ 165mm試験管にそれぞれ接種し、30 $^{\circ}$ Cで2日間培養した。その培養液0.5mlを、5%ソルボース、0.1%グルコース、0.9%バクトトリプトン(Difco社)、0.45%酵母エキス(Difco社)、0.9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウムからなる2KLG A生産用培地(pH7.4)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、30 $^{\circ}$ Cで5日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルボース、ソルボソン、2KLG AおよびL-イドン酸を定量した。ソルボース、ソルボソン、2KLG AおよびL-イドン酸はそれぞれ以下の条件でHPLCにより定量した。

[ソルボース]

カラム: Polyspher OA KC (7.8mm内径 $\times$ 300mm;  
Cica-MERCK)

移動相：0.01N  $\text{H}_2\text{SO}_4$

カラム温度：室温

流速：0.4ml/分

検出：示差屈折計

[ソルボソル (ポストカラムラベリング法)]

カラム：Polyspher OA KC (7.8mm内径×300mm;  
Cica-MERCK)

移動相 (ラベル化剤)：0.04M塩酸ベンズアミジン

0.25M亜硫酸カリウム

2mMホウ酸/0.1N水酸化カリウム

流速：0.3ml/分

検出：蛍光検知器 (励起波長：315nm, 検出波長405nm)

[2KLGAおよびL-イドン酸]

カラム：Capcell pak NH2 (4.6mm内径×250mm;  
資生堂)

移動相：30%アセトニトリル, 20mMリン酸カルシウム (pH3.0)

流速：1.2ml/分

検出：UV-210nm

その結果、Ps./pBBR (Km) -SDH・SNDHのソルボースから2KLGAへの変換率は約18%、L-イドン酸への変換率を合わせると約37%であった。また、Ps./pBBR (Tc) -SDH・SNDHのソルボースから2KLGAへの変換率は約26%、L-イドン酸への変換率を合わせると約47%であった (表3)。

表 3

形質転換株の培養結果 (mg/ml)

| 形質転換株                         | ソルボース       | ソルボソン     | 2KLGA      | L-イドン酸     |
|-------------------------------|-------------|-----------|------------|------------|
| <i>Ps.</i> /pBBR(Km)-SDH·SNDH | 12.5 (25.0) | 0.3 (0.6) | 8.9 (17.8) | 9.6 (19.6) |
| <i>Ps.</i> /pBBR(Tc)-SDH·SNDH | 15.6 (31.2) | 0.15(0.3) | 13 (26.0)  | 10.3(20.6) |

括弧内の数値は変換率（初期ソルボース濃度に対する生成物濃度の％）を表す。

比較のために、非形質転換株シュードモナス *sp.* F-1の2KLGAおよびL-イドン酸生産についても調べた。シュードモナス *sp.* F-1のグリセロール凍結保存菌体を、5mlのL培地を含む16.5×165mm試験管に接種し、30℃で1日間培養した。その培養液1mlを5%ソルボース、0.9%バクトトリプトン(Difco社)、0.45%酵母エキス(Difco社)、0.9%塩化ナトリウムからなる培地(pH7.4)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、30℃で3日間培養した。培養液を遠心分離し、同様に培養上清中のソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸を定量した。その結果、ソルボースは5.7mg/mlと消費されていたが、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸は検出されなかった。

以上より、2KLGAおよびL-イドン酸非生産性のシュードモナス *sp.* F-1にSNDH/SDH遺伝子を導入することにより、ソルボースから2KLGAおよびL-イドン酸を高生産する形質転換株を得ることができた。

**実施例5** SNDH/SDH発現ベクターを有するシュードモナス形質転換株の作製および該形質転換株による2KLGA生産性の検討(2)

実施例4と同様にして、シュードモナス属に属する別の菌株(シュードモナスIFO3309株;(財)発酵研究所(大阪市淀川区十三本町2-17-85)より分与を受けた)を宿主として、SNDH/SDH遺伝子を導入した形質転換株

を作製し、該形質転換株における2KLGAおよびL-イドン酸生産性を調べた。

(1) シュードモナスIFO3309株へのSNDH/SDH遺伝子の導入

シュードモナスIFO3309株のグリセロール凍結保存菌体を、実施例4の(2)と同様の方法で処理し、コンピテント細胞の凍結保存菌体を調製した。液体窒素中で凍結保存された該コンピテント細胞を氷水中で解凍した後、SNDH/SDH発現広域プラスミドであるPs./pBBR(Km)-SDH・SNDHの溶液1 $\mu$ l(約1 $\mu$ g)を加え、4℃で30分間保持した。これをジーンバルサー遺伝子導入装置(バイオラッド社)を用い、実施例4の(3)と同様の条件で形質転換して、形質転換株Ps. IFO3309/pBBR(Km)-SDH・SNDHを取得した。

(2) 形質転換株における2KLGAの発酵生産

上記(1)で得られたPs. IFO3309/pBBR(Km)-SDH・SNDHの1白金耳を、2%ソルビトール、0.5%酵母エキス(Difco社)からなる培地(pH7.0)5mlを含む16.5×165mm試験管に接種し、28℃で1日間培養した。その培養液1mlを5%ソルビトール、0.5%酵母エキス(Difco社)、0.2%ポリペプトン(和光純薬)、0.1%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.5%MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、2%CaCO<sub>3</sub>からなる培地(pH7.0)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、28℃で7日間培養した。培養液を遠心分離し、実施例4の(4)と同様にして培養上清中のソルビトール、ソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸を定量した。比較のために、非形質転換株シュードモナスIFO3309株を同じ条件で培養し、培養上清中のソルビトール、ソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸を定量した。

その結果、非形質転換株では、ソルビトールは0.4mg/mlと消費され、ソルボースは3.9mg/mlと生産していたが、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸は検出されなかった。一方、形質転換株Ps. IFO3309/

pBBR (Km) -SDH・SNDHでは、1.2mg/mlの2KLGAと、0.5mg/mlのL-イドン酸を生産していた(表4)。すなわち、シュードモナスIFO3309が2KLGAおよびL-イドン酸を生産できない条件下でも、SNDH/SDH遺伝子を該宿主に導入することにより、ソルビトールから2KLGAおよびL-イドン酸を生産する能力が付与されることが確認された。

表4

形質転換株の培養結果 (mg/ml)

| 形質転換株                             | ソルボース | ソルボソン | 2KLGA | L-イドン酸 |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|--------|
| <i>Ps.</i> 3309/pBBR(Km)-SDH・SNDH | 0.41  | 1.8   | 1.2   | 0.5    |

実施例6 SLDH発現ベクターおよびSNDH/SDH発現ベクターを導入したシュードモナス形質転換株による2KLGAの製造

(1) SLDH発現ベクターおよびSNDH/SDH発現ベクターを有するシュードモナス形質転換株の作製

上述のように、pBBR1MCS-2にG. オキシダンスT-100 (FERMBP-4188; 欧州特許出願公開公報EP 0758679 A1) 由来のSNDH/SDH遺伝子を組み込んだ発現ベクターpBBR (Km) -SDH・SNDH (図5) を構築した。実施例1の(5) で得られた組換えシュードモナス*Ps.* /pUCP19-B7SX2に、pBBR (Km) -SDH・SNDHをエレクトロポレーション法を用いて導入し、*Ps.* /pUCP19-B7SX2+pBBR (Km) -SDH・SNDHを得た。

(2) シュードモナス形質転換株による2KLGAの生産

*Ps.* /pUCP19-B7SX2+pBBR (Km) -SDH・SNDHを、5%ソルビトール、1%バクトトリプトン (Difco社)、0.5%酵母エキス (Difco社)、1%塩化ナトリウム、50μg/mlアンピシリン、50μg

／ml カナマイシン、2%軽質炭酸カルシウムからなる培地 (pH 7.4) で 30℃、4日間培養したところ、1.1mg/ml の 2KLG A と 1.7mg/ml の イドン酸が得られた。2KLG A については、HPLC で分取し、標品との保持時間の一致を確認した。さらに、GC/MS を用いて、標品とのマスパターンの一致を確認した。HPLC および GC/MS はそれぞれ実施例 1 の (3) および (5) と同様の条件で行った。

#### 実施例 7 種々のシュードモナス形質転換株の作製

(1) Ps. /pUCP19-SLDH+pBBR (Km) -SDH・SNDH  
 実施例 2 の (1) で構築した pUCP19-SLDH でシュードモナス sp. F-1 を形質転換して Ps. /pUCP19-SLDH を得た。該組換えシュードモナスにさらに pBBR (Km) -SDH・SNDH を導入して、Ps. /pUCP19-SLDH+pBBR (Km) -SDH・SNDH を得た。

(2) Ps. /pUCP19-SLDH-tufB+pBBR (Km) -SDH・SNDH

SLDH 遺伝子の開始コドンの上流に SspI 部位を導入するために、pUCP19-SLDH (5μg) をテンプレートとして、下記プライマー (各 20 pmol) 存在下で、pfu DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を用いて PCR を行った (94℃, 30 秒→55℃, 2 分→72℃, 2 分, 25 サイクル)。

センスプライマー [SspI 部位 (下線部) および SLDH コーディング配列の 5' 末端と一致する配列を含む]

TAGGAATATTTCTCATGATTACGCGCAAACCC (配列表配列番号 19)

アンチセンスプライマー [SLDH コーディング配列内の EagI 部位の下流の配列と一致する配列]

GATGCTTCAGCACGGC (配列表配列番号 20)

PCR で特異的に増幅した約 360 bp の断片を SspI と EagI で消化し



た。また、pUCP19-SLDHをPst IとEag Iで消化し、約5.7 kbの断片を得た。これら2つの断片とtufBプロモーターを含むPst I-Ssp I断片（配列表配列番号21）をT4DNAリガーゼで連結し、pUCP19-SLDH-tufBを構築した。そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、Ps. /pUCP19-SLDH-tufBを得た。さらに、SNDH/SDH活性を発現するpBBR (Km) -SDH・SNDHを導入し、Ps. /pUCP19-SLDH-tufB+pBBR (Km) -SDH・SNDHを得た。

### (3) Ps. /pUCP19-3DH

5  $\mu$ gのpUCP19-SLDH-tufBを40 UのKpn Iと40 UのPst Iで37°C、1時間消化し、1.6 kb断片を得た。また、1  $\mu$ gのpUCP19-SDH・SNDH（pUCP19にG. オキシダンスT-100由来のSNDH/SDH遺伝子を組み込んだ発現ベクター；図7）を10 UのKpn Iと10 UのPst Iで37°C、1時間消化し、8.2 kbの断片を得た。これら2つの断片をT4DNAリガーゼで連結し、pUCP19-3DHを構築した。そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、Ps. /pUCP19-3DHを得た。

## 実施例8 2KLGAの生産性の検討

組換えシュードモナスによる2KLGAの生産が確認できたので、実施例6および7で得られた4種の形質転換株を用いて、種々の組成の培地での2KLGAの生産性を検討した。

### [培養1]

1%バクトトリプトン(Difco社)、0.5%酵母エキス(Difco社)、1%NaCl、50  $\mu$ g/mlアンピシリン、50  $\mu$ g/mlカナマイシンからなる培地(pH7.4) 2mlを含む15ml容チューブ(ファルコン社)に、

*Ps.* /pUCP19-B7SX2+pBBR (Km)-SDH·SNDHの凍結保存菌体の1白金耳を植菌し、30℃で24時間前培養した。前培養液0.5 mlを、5%ソルビトール、5%酵母エキス(Difco社)、0.15%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、50  $\mu g/ml$ アンピシリン、50  $\mu g/ml$ カナマイシン、4%炭酸カルシウムからなる本培養培地(pH7.0)10 mlを含む100 ml容三角フラスコに植菌し、30℃で3日間培養した。

[培養2]

本培養培地の5%酵母エキスを5%カザミノ酸に変えた以外は、[培養1]と同様にして培養した。

[培養3]

本培養培地に1%グリセロールをさらに添加した以外は、[培養1]と同様にして培養した。

[培養4]

生産菌として*Ps.* /pUCP19-SLDH+pBBR (Km)-SDH·SNDHを用い、本培養培地に5%グリセロールをさらに添加した以外は、[培養1]と同様にして培養した。

[培養5]

生産菌として*Ps.* /pUCP19-SLDH-tufB+pBBR (Km)-SDH·SNDHを用い、本培養培地に5%グリセロールを添加した以外は、[培養1]と同様にして培養した。

[培養6]

生産菌として*Ps.* /pUCP19-3DHを用い、前培養培地と本培養培地からカナマイシンを除き、さらに本培養培地に5%グリセロールを添加した以外は、[培養1]と同様にして培養した。

各培養におけるソルビトール、ソルボース、ソルボソンおよび2KLG Aを定量した。その結果を表5に示す。培地にグリセロールを添加することにより2K

LGAへの変換率が向上する傾向が認められた。

[培養7]

本培養培地の酵母エキス濃度を2%とし、さらに5%グリセロールを添加した以外は、[培養1]と同様の条件で、7日間培養した。培養1, 3, 5および7日目におけるソルビトール、ソルボース、ソルボソンおよび2KLGAを定量した。結果を表5に示す。

表5

| 培養 |    | ソルビトール | ソルボース | ソルボソン | 2KLGA | イドン酸 |
|----|----|--------|-------|-------|-------|------|
| 1  |    | 44.1   | 6.3   | 0.1   | 3.7   | 1.6  |
| 2  |    | 44.8   | 3.1   | 0     | 4.8   | 2.2  |
| 3  |    | 26.7   | 5.1   | 0     | 10.9  | 8.4  |
| 4  |    | 26.6   | 0     | 0     | 9.0   | ND   |
| 5  |    | 26.6   | 0     | 0     | 10.7  | ND   |
| 6  |    | 30.7   | 5.2   | 0     | 7.5   | ND   |
| 7  | 日数 | ソルビトール | ソルボース | ソルボソン | 2KLGA | イドン酸 |
|    | 1  | 41.1   | 0     | 0     | 4.2   | ND   |
|    | 3  | 25.6   | 0     | 0     | 10.6  | ND   |
|    | 5  | 14.2   | 0     | 0     | 16.3  | ND   |
|    | 7  | 7.6    | 0     | 0     | 18.4  | 15.5 |

(単位: mg/ml)

ND: 定量していない

実施例9 SLDH発現ベクターおよび/またはSNDH/SDH発現ベクターを導入したシュードモナス・ブチーダ形質転換株によるソルボースまたは2KL

## GAの発酵生産

以下の実験において、シュードモナス・ブチーダIFO3738株のコンピテント細胞の調製および形質転換は、上記シュードモナス sp. F-1と同様にして行った。但し、シュードモナス・ブチーダIFO3738株はアンピシリン耐性のため、選択マーカーとしてアンピシリン耐性を用いる場合には、エレクトロポレーション後、500  $\mu$ g/mlアンピシリン（通常の10倍量）を含むL寒天プレートに細胞を播き、30℃で1日培養して、コロニーの大きいものをピックアップすることにより、形質転換体を選択した。

### (1) SLDH発現ベクターを導入した形質転換株によるソルビトールからのソルボースの発酵生産

シュードモナス・ブチーダIFO3738株にSLDH遺伝子（pUCP19-SLDH）を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・ブチーダIFO3738/pUCP19-SLDHのシングルコロニーを、5%ソルビトール、0.9%バクトトリプトン（Difco社）、0.45%酵母エキス（Difco社）、0.9%塩化ナトリウムおよび500  $\mu$ g/mlアンピシリンからなるソルボース生産用培地（pH7.4）10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、30℃で3日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルビトールおよびソルボースを定量した。その結果、34.6 mg/mlのソルビトールが残存し、7.6 mg/mlのソルボースが生成した。

### (2) SNDH/SDH発現ベクターを導入した形質転換株によるソルボースからの2KLGAの発酵生産

シュードモナス・ブチーダIFO3738にSNDH/SDH遺伝子（pBBR(Km)-SDH-SNDH）を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・ブチーダIFO3738/pBBR(Km)-SDH-SNDHのシングルコロニーを、5%ソルボース、0.9%バクトトリプトン（Difco社）、0.45%酵母エキス（Difco社）、0.9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウ

ムおよび50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンからなる2KLGA生産用培地(pH7.4)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、30°Cで7日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルボース、2KLGAおよびイドン酸を定量した。その結果、34.3  $\text{mg}/\text{ml}$ のソルボースが残存し、13.9  $\text{mg}/\text{ml}$ の2KLGAおよび3.5  $\text{mg}/\text{ml}$ のイドン酸が生成した。

(3) SLDH発現ベクターおよびSNDH/SDH発現ベクターを導入した形質転換株によるソルビトールからの2KLGAの発酵生産

シュードモナス・ブチーダIFO3738株にSLDHおよびSNDH/SDH遺伝子(pUCP19-SLDHおよびpBBR(Km)-SDH・SNDH)を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・ブチーダIFO3738/pUCP19-SLDH+pBBR(Km)-SDH・SNDHのシングルコロニーを、5%ソルビトール、0.9%バクトトリプトン(Difco社)、0.45%酵母エキス(Difco社)、0.9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウム、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンおよび50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンからなる2KLGA生産用培地(pH7.4)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、30°Cで7日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルビトール、ソルボース、2KLGAおよびイドン酸を定量した。その結果、35.6  $\text{mg}/\text{ml}$ のソルビトールが残存し、13.2  $\text{mg}/\text{ml}$ の2KLGAおよび6.2  $\text{mg}/\text{ml}$ のイドン酸が生成した。ソルボースは検出されなかった。

配列リストのフリーテキスト

配列番号3：pUCP19-HCのインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号4：pUCP19-HCのインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号5：pUCP19-HCのインサートDNAのシーケンス用プライマ

ーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号6：pUCP19-HCのインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号7：pUCP19-HCのインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号8：pUCP19-HCのインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号9：pUCP19-HCのインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号10：pUCP19-HCのインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号11：pUCP19-HCのインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号12：pUCP19-HCのインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号13：pUCP19-HCのインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号14：His-tagged SLDH およびプロモーターをコードするDNA配列を増幅するためのセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号15：His-tagged SLDH およびプロモーターをコードするDNA配列を増幅するためのアンチセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号16：SLDH遺伝子の3'非コーディング領域のDNA配列を増幅するためのセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号17：SLDH遺伝子の3'非コーディング領域のDNA配列を増幅するためのアンチセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号18：SLDHのN末端アミノ酸配列。

配列番号19：SLDHコーディング配列の5'上流領域にSspI制限部位を導入するためのPCRプライマー（センス）として働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号20：SLDHコーディング配列の5'上流領域にSspI制限部位を導入するためのPCRプライマー（アンチセンス）として働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

本出願は日本で出願された平成11年特許願第72810号および平成11年特許願第224679号を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含されるものである。

また、本明細書において引用された特許および特許出願を含む文献は、引用したことによってその内容のすべてが開示されたと同程度に本明細書中に組み込まれるものである。

## 請 求 の 範 囲

1. 下記の理化学的性質を有するソルビトールデヒドロゲナーゼ。

(a) 作用：D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する

(b) 分子量：約54 kDa

(c) 補酵素：NAD(P)<sup>+</sup>依存性

(d) 基質特異性：ソルビトール、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化し、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールに作用しない

2. グルコノバクター・オキシダンスG624株由来である請求項1記載のソルビトールデヒドロゲナーゼ。

3. 請求項2記載のソルビトールデヒドロゲナーゼと分子進化上、同一の遺伝子を起源とするソルビトールデヒドロゲナーゼ。

4. グルコノバクター属に属する細菌由来である請求項3記載のソルビトールデヒドロゲナーゼ。

5. 以下の(a)または(b)の蛋白質であるソルビトールデヒドロゲナーゼ。

(a) 配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 上記(a)のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなり、且つD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する蛋白質

6. 請求項1～5のいずれかに記載のソルビトールデヒドロゲナーゼをコードするDNA。

7. 以下の(a)または(b)のDNAである請求項6記載のDNA。

(a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列からなるDNA

(b) 上記(a)の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA

8. グルコノバクター属に属する細菌由来である請求項6または7記載のDNA。



9. 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列からなるDNAおよびその部分DNAとハイブリダイズし得るDNAであって、ソルビトールデヒドロゲナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。

10. 請求項9記載の遺伝子によってコードされ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ活性を有するグルコノバクター属由来の蛋白質。

11. 以下の(a)または(b)のDNAからなるプロモーター遺伝子。

(a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号1～536で示される塩基配列からなるDNA

(b) 上記(a)の塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも1種の微生物においてプロモーター活性を有するDNA

12. 請求項6～9のいずれかに記載のDNAを含む組換えベクター。

13. 請求項6～9のいずれかに記載のDNAを含む発現ベクター。

14. ソルボースデヒドロゲナーゼをコードするDNAおよび/またはソルボソndeヒドロゲナーゼをコードするDNAをさらに含む請求項13記載の発現ベクター。

15. 請求項13または14記載の発現ベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

16. 大腸菌、シュードモナス属、グルコノバクター属、アセトバクター属およびシュードグルコノバクター属からなる群より選択される属に属する請求項15記載の形質転換体。

17. D-ソルビトールを2-ケトーL-グロン酸に変換する能力を有する請求項15または16記載の形質転換体。

18. 請求項13記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から請求項1～5のいずれかに記載のソルビトールデヒドロ

ゲナーゼまたは請求項 10 記載の蛋白質を採取することを含むソルビトールデヒドロゲナーゼ活性を有する蛋白質の製造方法。

19. 請求項 13 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に D-ソルビトールを接触させる工程を含む L-ソルボースの製造方法。

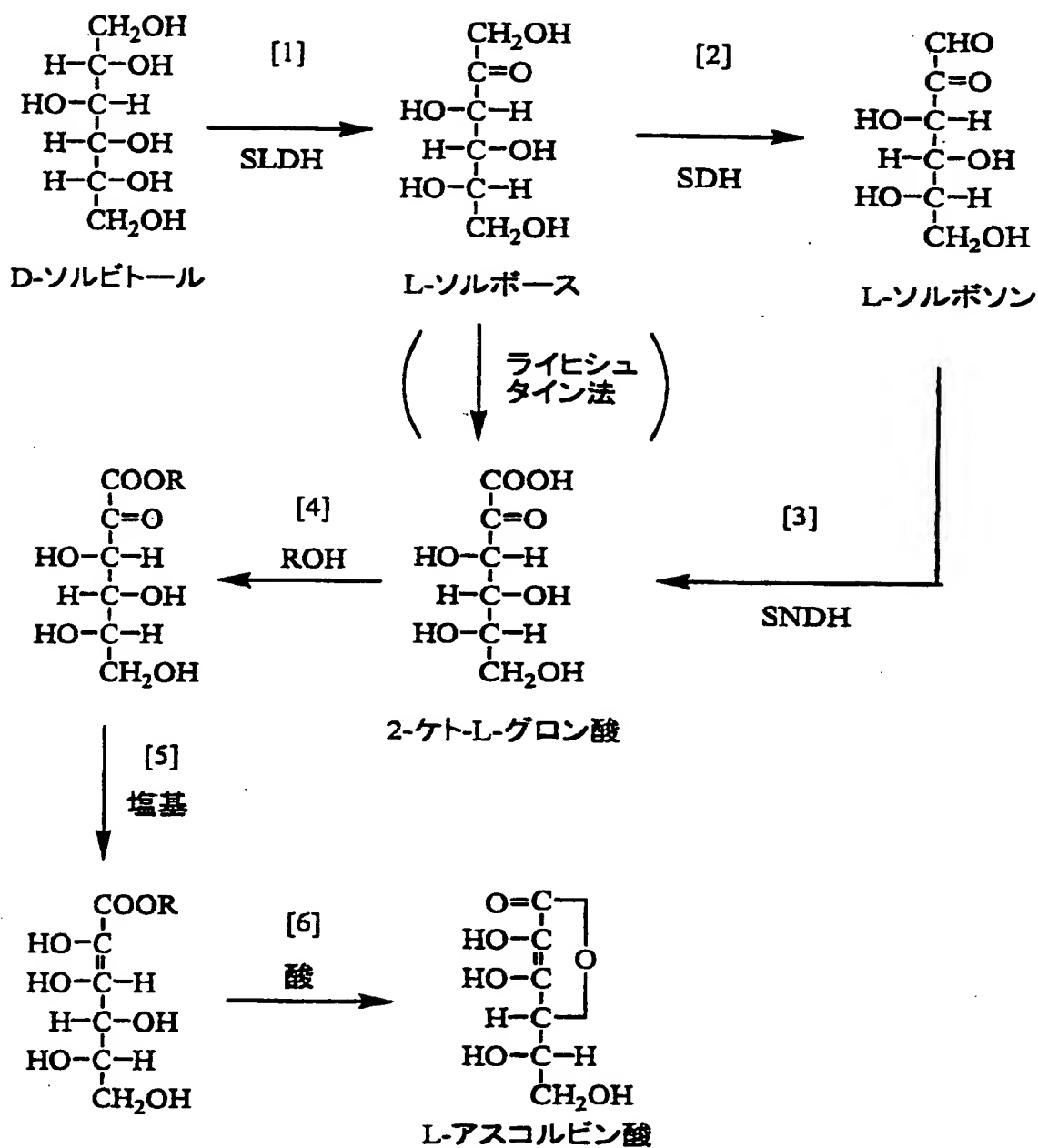
20. ソルボースデヒドロゲナーゼをコードする DNA およびソルボソンドヒドロゲナーゼをコードする DNA を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に請求項 19 記載の方法により得られる L-ソルボースを接触させる工程を含む 2-ケトー-L-グロン酸の製造方法。

21. 請求項 17 記載の形質転換体を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に D-ソルビトールを接触させる工程を含む 2-ケトー-L-グロン酸の製造方法。

22. 請求項 20 または 21 記載の方法により得られる 2-ケトー-L-グロン酸を、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩に変換する工程を含む、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩の製造方法。

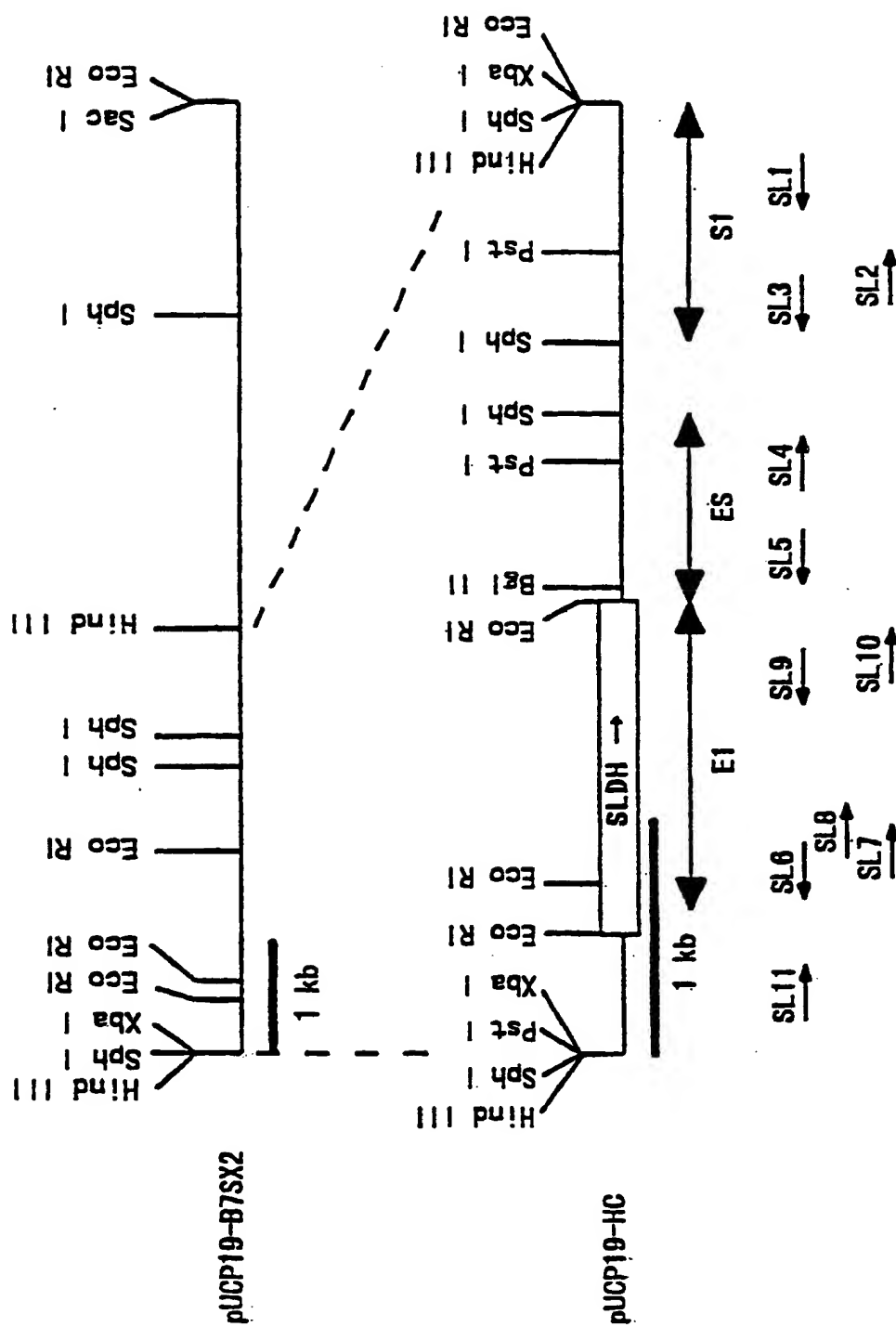
1/7

## 第 1 図



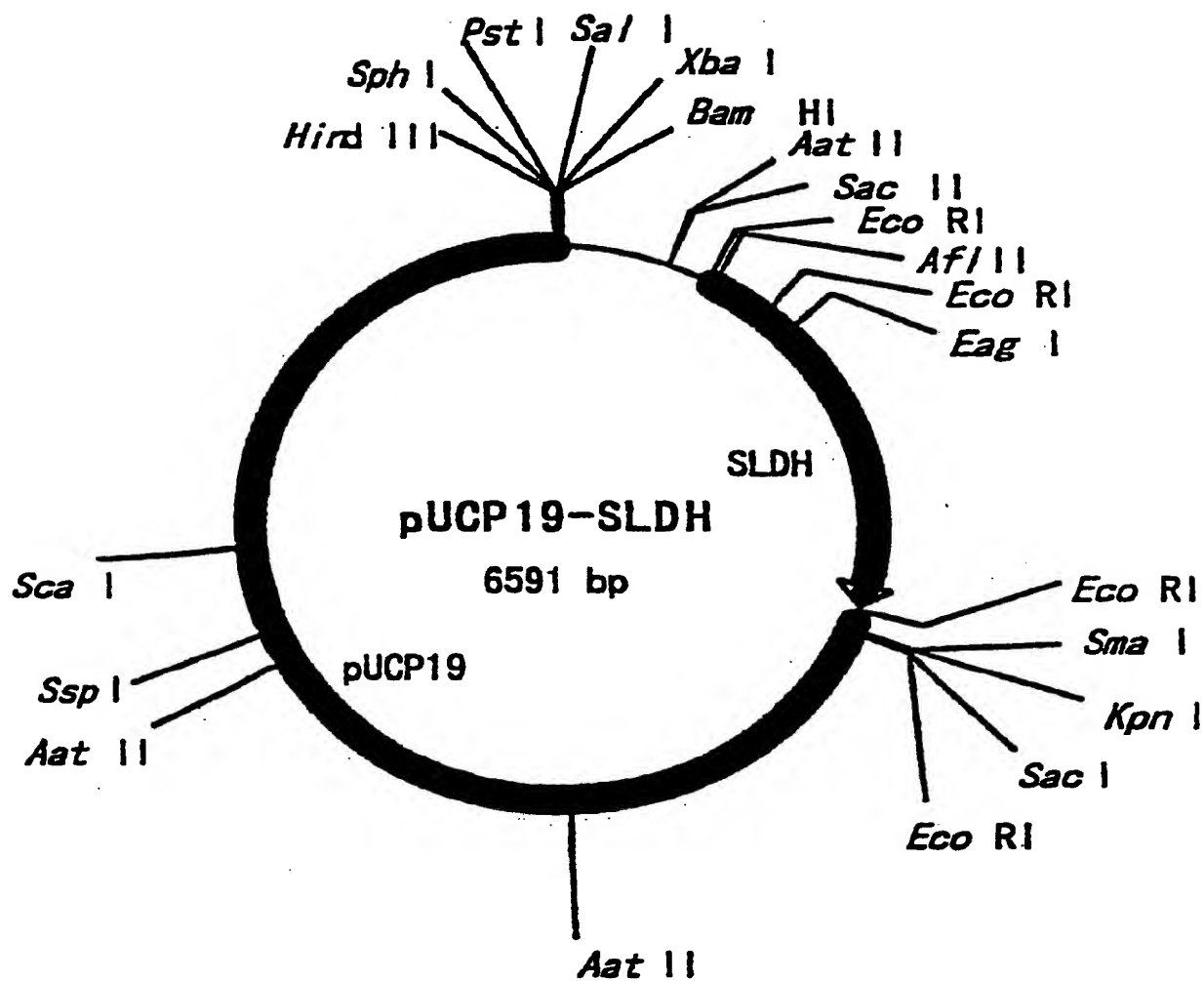
2/7

第 2 図



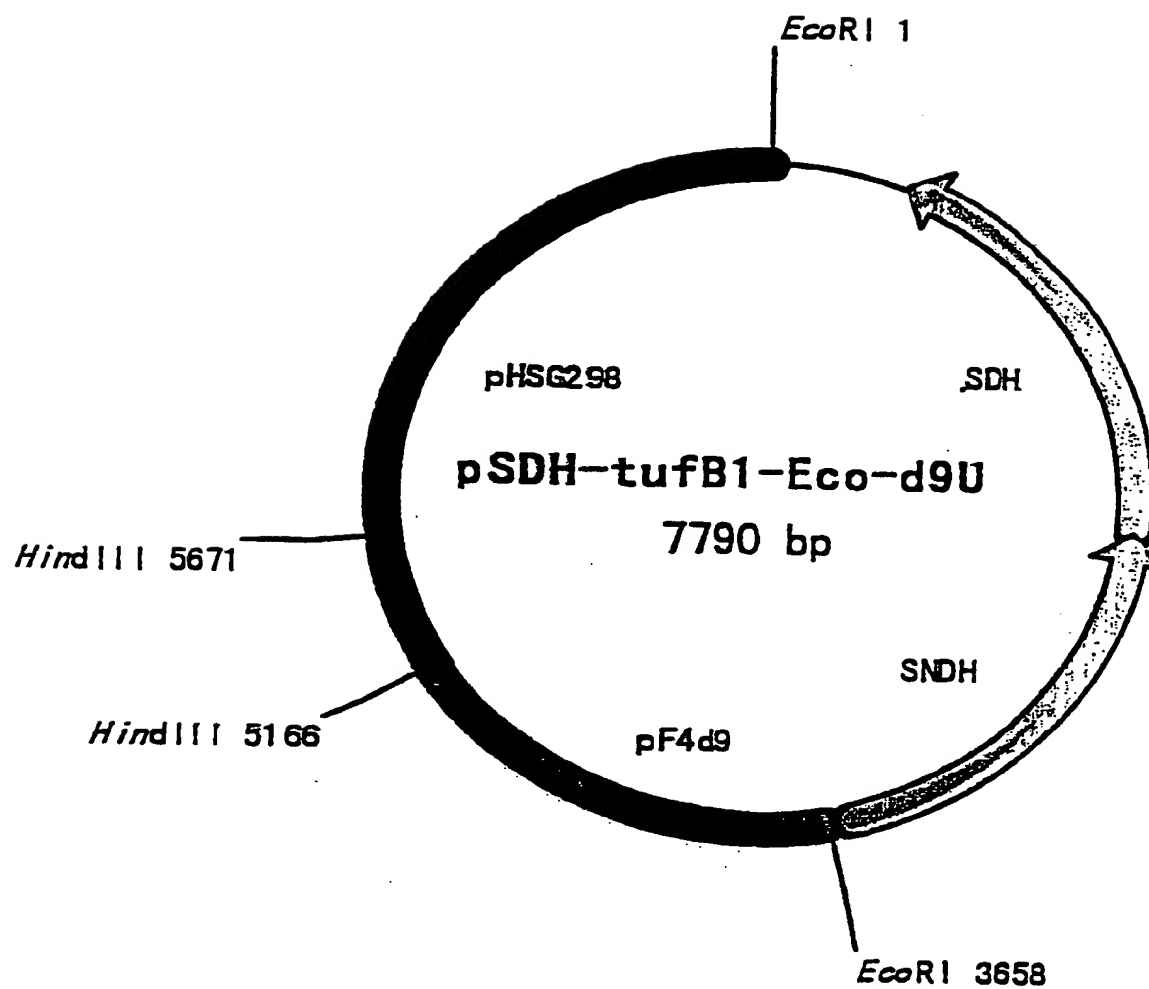
3/7

第 3 図



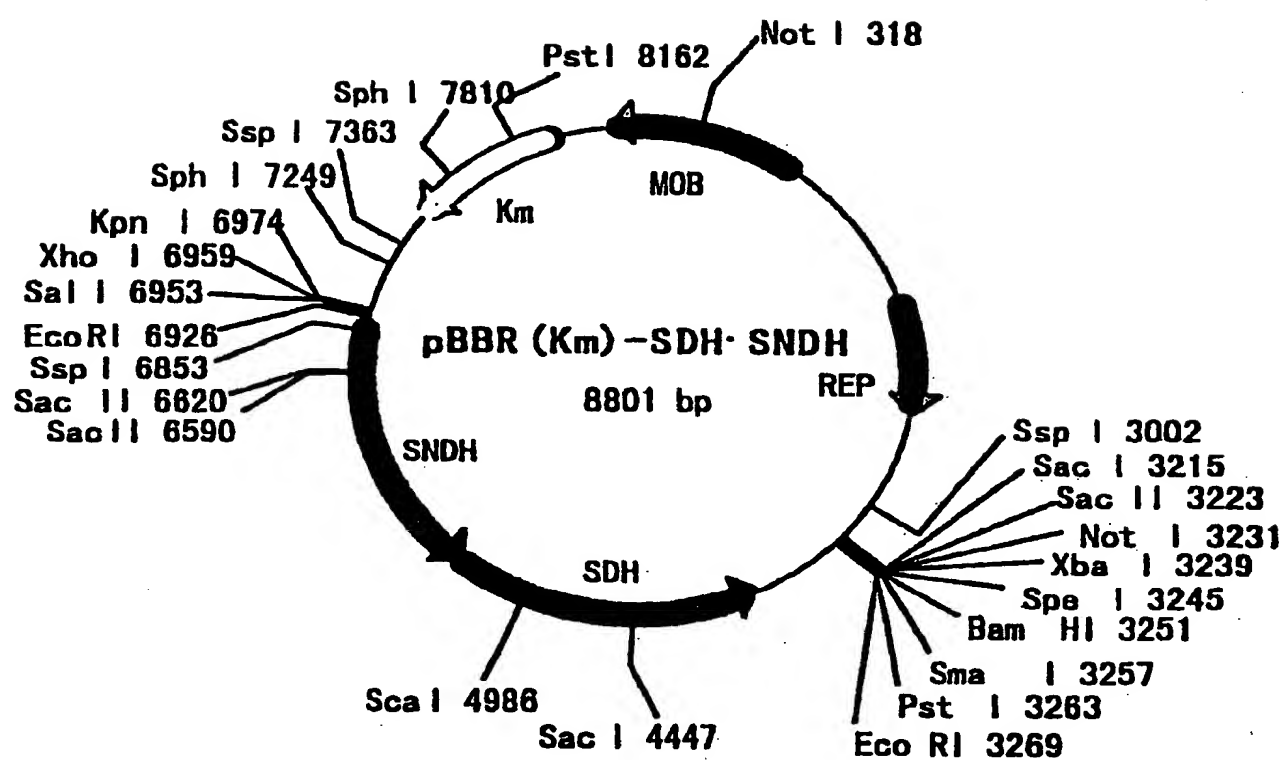
4/7

第 4 図



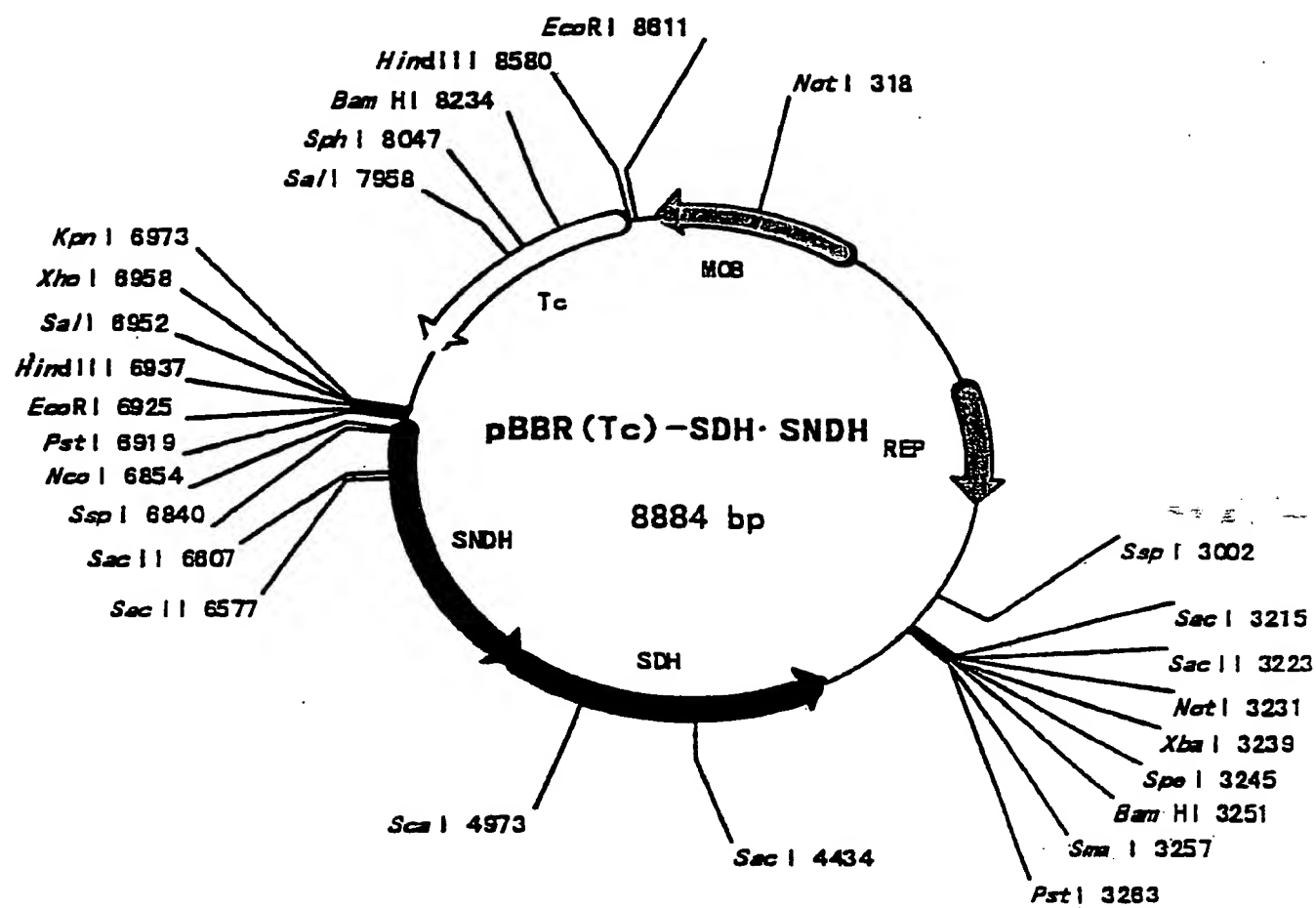
5/7

## 第 5 図



6/7

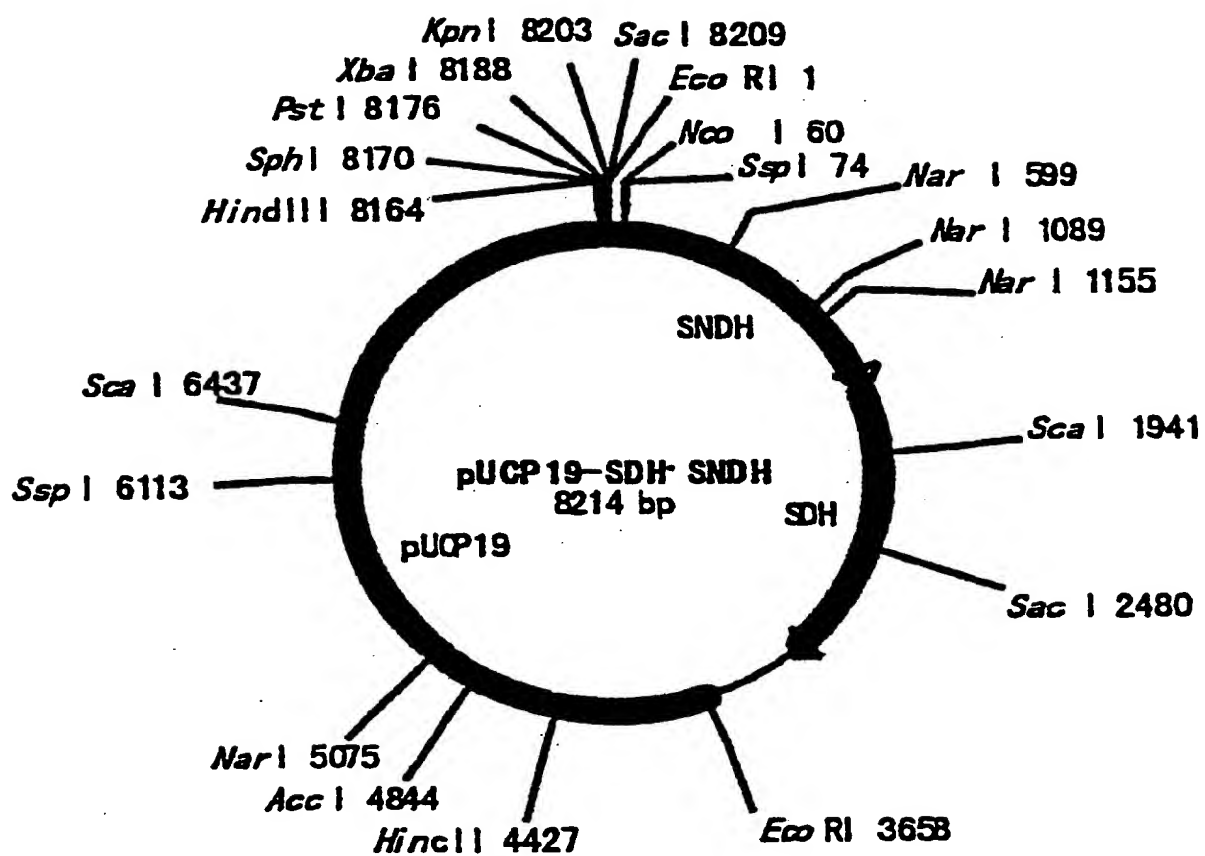
## 第 6 図





7/7

## 第 7 図



1/12

## SPECIMEN SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

&lt;120&gt; Sorbitol Dehydrogenase, Gene Coding Thereof and Use Thereof

&lt;130&gt; 09348

&lt;150&gt; JP 11-72810

&lt;151&gt; 1999-03-17

&lt;150&gt; JP 11-224679

&lt;151&gt; 1999-08-06

&lt;160&gt; 20

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 485

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Gluconobacter oxydans

&lt;400&gt; 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ile | Thr | Arg | Glu | Thr | Leu | Lys | Ser | Leu | Pro | Ala | Asn | Val | Gln | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Pro | Pro | Tyr | Asp | Ile | Asp | Gly | Ile | Lys | Pro | Gly | Ile | Val | His | Phe | Gly |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Val | Gly | Asn | Phe | Phe | Arg | Ala | His | Glu | Ala | Phe | Tyr | Val | Glu | Gln | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Leu | Glu | His | Ala | Pro | Asp | Trp | Ala | Ile | Val | Gly | Val | Gly | Leu | Thr | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Ser | Asp | Arg | Ser | Lys | Lys | Lys | Ala | Glu | Glu | Phe | Lys | Ala | Gln | Asp | Cys |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Leu | Tyr | Ser | Leu | Thr | Glu | Thr | Ala | Pro | Ser | Gly | Lys | Ser | Thr | Val | Arg |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Val | Met | Gly | Ala | Leu | Arg | Asp | Tyr | Leu | Leu | Ala | Pro | Ala | Asp | Pro | Glu |
|     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ala | Val | Leu | Lys | His | Leu | Val | Asp | Pro | Ala | Ile | Arg | Ile | Val | Ser | Met |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Thr | Ile | Thr | Glu | Gly | Gly | Tyr | Asn | Ile | Asn | Glu | Thr | Thr | Gly | Ala | Phe |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

2/12

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Leu | Glu | Asn | Ala | Ala | Val | Lys | Ala | Asp | Leu | Lys | Asn | Pro | Glu | Lys | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Pro | Ser | Thr | Val | Phe | Gly | Tyr | Val | Val | Glu | Ala | Leu | Arg | Arg | Arg | Trp | 165 | 170 | 175 |     |
| Asp | Ala | Gly | Gly | Lys | Ala | Phe | Thr | Val | Met | Ser | Cys | Asp | Asn | Leu | Arg | 180 | 185 | 190 |     |
| His | Asn | Gly | Asn | Val | Ala | Arg | Lys | Ala | Phe | Leu | Gly | Tyr | Ala | Lys | Ala | 195 | 200 | 205 |     |
| Arg | Asp | Pro | Glu | Leu | Ala | Lys | Trp | Ile | Glu | Glu | Asn | Ala | Thr | Phe | Pro | 210 | 215 | 220 |     |
| Asn | Gly | Met | Val | Asp | Arg | Ile | Thr | Pro | Thr | Val | Ser | Ala | Glu | Ile | Ala | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Lys | Lys | Leu | Asn | Ala | Ala | Ser | Gly | Leu | Asp | Asp | Asp | Leu | Pro | Leu | Val | 245 | 250 | 255 |     |
| Ala | Glu | Asp | Phe | His | Gln | Trp | Val | Leu | Glu | Asp | Gln | Phe | Ala | Asp | Gly | 260 | 265 | 270 |     |
| Arg | Pro | Pro | Leu | Glu | Lys | Ala | Gly | Val | Gln | Met | Val | Gly | Asp | Val | Thr | 275 | 280 | 285 |     |
| Asp | Trp | Glu | Tyr | Val | Lys | Ile | Arg | Met | Leu | Asn | Ala | Gly | His | Val | Met | 290 | 295 | 300 |     |
| Leu | Cys | Phe | Pro | Gly | Ile | Leu | Val | Gly | Tyr | Glu | Asn | Val | Asp | Asp | Ala | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Ile | Glu | Asp | Ser | Glu | Leu | Leu | Gly | Asn | Leu | Lys | Asn | Tyr | Leu | Asn | Lys | 325 | 330 | 335 |     |
| Asp | Val | Ile | Pro | Thr | Leu | Lys | Ala | Pro | Ser | Gly | Met | Thr | Leu | Glu | Gly | 340 | 345 | 350 |     |
| Tyr | Arg | Asp | Ser | Val | Ile | Ser | Arg | Phe | Ser | Asn | Lys | Ala | Met | Ser | Asp | 355 | 360 | 365 |     |
| Gln | Thr | Leu | Arg | Ile | Ala | Ser | Asp | Gly | Cys | Ser | Lys | Val | Gln | Val | Phe | 370 | 375 | 380 |     |
| Trp | Thr | Glu | Thr | Val | Arg | Arg | Ala | Ile | Glu | Asp | Lys | Arg | Asp | Leu | Ser | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Arg | Ile | Ala | Phe | Gly | Ile | Ala | Ser | Tyr | Leu | Glu | Met | Leu | Arg | Gly | Arg | 405 | 410 | 415 |     |
| Asp | Glu | Lys | Gly | Gly | Thr | Tyr | Glu | Ser | Ser | Glu | Pro | Thr | Tyr | Gly | Asp | 420 | 425 | 430 |     |
| Ala | Glu | Trp | Lys | Leu | Ala | Lys | Ala | Asp | Asp | Phe | Glu | Ser | Ser | Leu | Lys | 435 | 440 | 445 |     |
| Leu | Pro | Ala | Phe | Asp | Gly | Trp | Arg | Asp | Leu | Asp | Thr | Ser | Glu | Leu | Asp | 450 | 455 | 460 |     |

3/12

Gln Lys Val Ile Val Leu Arg Lys Ile Ile Arg Glu Lys Gly Val Lys  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Ile Pro Ala  
 485

<210> 2  
 <211> 4115  
 <212> DNA  
 <213> Gluconobacter oxydans

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (537)..(1994)

<400> 2  
 aagcttgcat gcctgcaggt cgactctaga ggatccggtt ttggcagcgc tccctagatt 60  
 gatgcggcgt ctgttgaccg acatgatgct ggtggcaegt gccattgcga cggggcgtgc 120  
 gaccgggaac acaggcctgc tgcctttgta caaggggctg agtcatgcgc tgcgtgggct 180  
 ggcacatagt tgcgaagagc agttgcgcgc aaagcagaac cagcatgaac agcagtcgga 240  
 agacgaggaa atcctcggcc tcctaccgcg attggaagag cagacccgtc ctgagatgcg 300  
 ttttgtgatg tccctgttcc gcgaggatct cgaacgggct gttgggggtgc tcatgcgttc 360  
 tgatgcgagt gccgcaaaag gtctctgaac aggacgtccc gcggagggca gtcagaggtc 420  
 gaaatggctc ctgttgaaac cgtcattcgg tttttacgtt gtttcggggc tatgatggca 480  
 catgcccggc cttgtcggtc cccgtcagcg accggcccga aaccacggag aattcc atg 539  
 Met  
 1  
 att acg cgc gaa acc ctt aag tct ctt cct gcc aat gtc cag gct ccc 587  
 Ile Thr Arg Glu Thr Leu Lys Ser Leu Pro Ala Asn Val Gln Ala Pro  
 5 10 15  
 ccc tat gac atc gac ggg atc aag cct ggg atc gtg cat ttc ggt gta 635  
 Pro Tyr Asp Ile Asp Gly Ile Lys Pro Gly Ile Val His Phe Gly Val  
 20 25 30  
 ggt aac ttt ttt cga gcc cat gag gcg ttc tac gtc gag cag att ctt 683  
 Gly Asn Phe Phe Arg Ala His Glu Ala Phe Tyr Val Glu Gln Ile Leu  
 35 40 45  
 gaa cac gct ccg gac tgg gcg att gtt ggt gtt ggc ctg acg ggc agt 731  
 Glu His Ala Pro Asp Trp Ala Ile Val Gly Val Gly Leu Thr Gly Ser  
 50 55 60 65  
 gac cgt tca aag aaa aaa gcc gag gaa ttc aag gcc cag gac tgc ctg 779  
 Asp Arg Ser Lys Lys Lys Ala Glu Glu Phe Lys Ala Gln Asp Cys Leu

4/12

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |      |  |
| tat | tcc | ctg | acc | gag | acg | gct | ccg | tcc | ggc | aag | agc | acg | gtg | cgc | gtc | 827  |  |
| Tyr | Ser | Leu | Thr | Glu | Thr | Ala | Pro | Ser | Gly | Lys | Ser | Thr | Val | Arg | Val |      |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |      |  |
| atg | ggc | gcg | ctg | cgt | gac | tat | ctg | ctt | gcc | ccg | gcc | gat | ccg | gaa | gcc | 875  |  |
| Met | Gly | Ala | Leu | Arg | Asp | Tyr | Leu | Leu | Ala | Pro | Ala | Asp | Pro | Glu | Ala |      |  |
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| gtg | ctg | aag | cat | ctt | gtt | gat | ccg | gcc | atc | cgc | atc | gtt | tcc | atg | acg | 923  |  |
| Val | Leu | Lys | His | Leu | Val | Asp | Pro | Ala | Ile | Arg | Ile | Val | Ser | Met | Thr |      |  |
| 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| atc | acg | gaa | ggc | ggc | tac | aac | atc | aac | gag | acg | acc | ggt | gcg | ttc | gat | 971  |  |
| Ile | Thr | Glu | Gly | Gly | Tyr | Asn | Ile | Asn | Glu | Thr | Thr | Gly | Ala | Phe | Asp |      |  |
| 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     | 145 |     |     |     |      |  |
| ctg | gag | aat | gcg | gca | gta | aag | gcc | gac | ctc | aag | aac | ccg | gaa | aag | ccg | 1019 |  |
| Leu | Glu | Asn | Ala | Ala | Val | Lys | Ala | Asp | Leu | Lys | Asn | Pro | Glu | Lys | Pro |      |  |
| 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| tct | acc | gtt | ttc | ggt | tac | gtg | gtc | gag | gcc | ctg | cgt | cgt | cgt | tgg | gat | 1067 |  |
| Ser | Thr | Val | Phe | Gly | Tyr | Val | Val | Glu | Ala | Leu | Arg | Arg | Arg | Trp | Asp |      |  |
| 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| gcc | ggt | ggt | aag | gca | ttt | acg | gtc | atg | tcc | tgt | gat | aac | ctg | cgt | cat | 1115 |  |
| Ala | Gly | Gly | Lys | Ala | Phe | Thr | Val | Met | Ser | Cys | Asp | Asn | Leu | Arg | His |      |  |
| 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| aac | ggc | aat | gtc | gcc | cgc | aag | gcc | ttc | ctc | ggc | tat | gcg | aag | gcg | cgc | 1163 |  |
| Asn | Gly | Asn | Val | Ala | Arg | Lys | Ala | Phe | Leu | Gly | Tyr | Ala | Lys | Ala | Ala |      |  |
| 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| gat | ccg | gag | ttg | gcg | aag | tgg | att | gag | gaa | aac | gcg | acc | ttc | ccg | aac | 1211 |  |
| Asp | Pro | Glu | Leu | Ala | Lys | Trp | Ile | Glu | Glu | Asn | Ala | Thr | Phe | Pro | Asn |      |  |
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     | 225 |     |     |     |      |  |
| gga | atg | gtt | gat | cgc | atc | acc | ccg | acc | gtt | tgc | gcg | gaa | atc | gcc | aag | 1259 |  |
| Gly | Met | Val | Asp | Arg | Ile | Thr | Pro | Thr | Val | Ser | Ala | Glu | Ile | Ala | Lys |      |  |
| 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| aag | ctc | aac | gcg | gcc | agt | ggg | ctg | gat | gac | gac | ctg | ccg | ctg | gtg | gcc | 1307 |  |
| Lys | Leu | Asn | Ala | Ala | Ser | Gly | Leu | Asp | Asp | Asp | Leu | Pro | Leu | Val | Ala |      |  |
| 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| gag | gat | ttc | cat | cag | tgg | gtg | ctg | gaa | gac | cag | ttt | gcg | gat | ggc | cgt | 1355 |  |
| Glu | Asp | Phe | His | Gln | Trp | Val | Leu | Glu | Asp | Gln | Phe | Ala | Asp | Gly | Arg |      |  |
| 260 |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| ccg | ccg | ctt | gaa | aaa | gcc | ggc | gtg | cag | atg | gtc | ggg | gac | gtg | acg | gac | 1403 |  |
| Pro | Pro | Leu | Glu | Lys | Ala | Gly | Val | Gln | Met | Val | Gly | Asp | Val | Thr | Asp |      |  |
| 275 |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |

5/12

|  |      |
|--|------|
| tgg gag tac gtc aag atc cga atg ctc aat gca ggg cat gtc atg ctc  | 1451 |
| Trp Glu Tyr Val Lys Ile Arg Met Leu Asn Ala Gly His Val Met Leu  |      |
| 290 295 300 305  |      |
| tgc ttc cca ggc att ctg gtc ggc tat gag aat gtg gat gac gcc att  | 1499 |
| Cys Phe Pro Gly Ile Leu Val Gly Tyr Glu Asn Val Asp Asp Ala Ile  |      |
| 310 315 320  |      |
| gaa gac agc gaa ctc ctt ggc aat ctg aag aac tat ctc aac aag gat  | 1547 |
| Glu Asp Ser Glu Leu Leu Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu Asn Lys Asp  |      |
| 325 330 335  |      |
| gtc atc ccg acc ctg aag gcg cct tca ggc atg acg ctc gaa ggc tat  | 1595 |
| Val Ile Pro Thr Leu Lys Ala Pro Ser Gly Met Thr Leu Glu Gly Tyr  |      |
| 340 345 350  |      |
| cgg gac agc gtc atc agc cgt ttc tcc aac aag gcg atg tcg gac cag  | 1643 |
| Arg Asp Ser Val Ile Ser Arg Phe Ser Asn Lys Ala Met Ser Asp Gln  |      |
| 355 360 365  |      |
| acg ctc cgg att gct agc gat ggc tgt tcc aag gtt cag gtg ttc tgg  | 1691 |
| Thr Leu Arg Ile Ala Ser Asp Gly Cys Ser Lys Val Gln Val Phe Trp  |      |
| 370 375 380 385  |      |
| acg gaa acc gtg cgt cgg gcg atc gaa gac aag cgg gac ctg tca cgt  | 1739 |
| Thr Glu Thr Val Arg Arg Ala Ile Glu Asp Lys Arg Asp Leu Ser Arg  |      |
| 390 395 400  |      |
| ata gcg ttc gga att gca tcc tat ctc gaa atg ctg cgt ggt cgc gac  | 1787 |
| Ile Ala Phe Gly Ile Ala Ser Tyr Leu Glu Met Leu Arg Gly Arg Asp  |      |
| 405 410 415  |      |
| gag aag ggc ggg acg tat gaa tcg tcc gag ccg act tat ggc gac gcc  | 1835 |
| Glu Lys Gly Gly Thr Tyr Glu Ser Ser Glu Pro Thr Tyr Gly Asp Ala  |      |
| 420 425 430  |      |
| gaa tgg aag ttg gcc aag gcg gac gac ttc gaa agc tct ctg aag ctc  | 1883 |
| Glu Trp Lys Leu Ala Lys Ala Asp Asp Phe Glu Ser Ser Leu Lys Leu  |      |
| 435 440 445  |      |
| ccg gcg ttc gat ggg tgg cgc gat ctg gat acg tcc gaa ctg gat caa  | 1931 |
| Pro Ala Phe Asp Gly Trp Arg Asp Leu Asp Thr Ser Glu Leu Asp Gln  |      |
| 450 455 460 465  |      |
| aag gtc atc gtg ctg cgg aag atc atc cgc gaa aag ggc gta aaa gcc  | 1979 |
| Lys Val Ile Val Leu Arg Lys Ile Ile Arg Glu Lys Gly Val Lys Ala  |      |
| 470 475 480  |      |
| gcc atc ccg gcc tga attcggcttt tagggtagcgc actgaaacag aaaaccgcgc | 2034 |
| Ala Ile Pro Ala  |      |
| 485  |      |
| tctggaagga gcgcggtttt ttttatgtc agatctgtcc catcaggaca aggatcacga | 2094 |

6/12

|             |            |            |            |            |            |      |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| cgaccacgat  | caggacaagt | ccgctggagg | gggagcccca | tttcgaactg | tacggccatg | 2154 |
| acggcagcgc  | accgagatca | ggattacaag | aaggatcagt | cccatggcac | atctctcttg | 2214 |
| ccggttgaga  | ctggtctgtg | ttccgggtgt | ctaaaaagt  | tccgtagggg | cgcgaaagat | 2274 |
| caaagctgtc  | ggtcgcgctt | aatccgggtc | caagccgcat | tgatgcgggc | cacccggtcc | 2334 |
| tgtgcgcgtt  | tgcgctctgt | ctctgacata | ggtttctggg | ccagcacgtc | cggatgatgt | 2394 |
| tcgcggatca  | gggtgcgcca | gcgcacgcgg | atttctgtgt | cagttgcgct | gcggtgatg  | 2454 |
| ccgagaatac  | gataggcatc | cggctcggtt | ccgctggcgg | cgcgattgtt | gccgctttcg | 2514 |
| gcccgggtccc | atgctcctgg | cggcaggcca | aatgcccgt  | gaacgcgctg | cagaaaatcg | 2574 |
| atttccttcg  | ggtgaagctc | gcggtctggg | ccggcatcgg | cacgggcat  | acggaacagt | 2634 |
| gccgtcatga  | ggttctcaag | cggcgcgta  | ttatcgcat  | aggccttgcc | catttcgcgg | 2694 |
| gcatacatct  | cgaaatcgtc | cgctccggtc | cgggcgcgat | cgaacagcat | gccgacttcc | 2754 |
| ttggtgttat  | cgggggggaa | ctggaagcag | gtcttgaaag | cgttgatttc | gtgtcggttc | 2814 |
| accggcccg   | cgatcttcgc | cagcttcgcg | cacagggcaa | caaggccgat | ggcgtaaagc | 2874 |
| tgatctcggt  | tgccagggc  | cgcagcaatc | ttggcagcgc | cgaaaaagge | cgcgctgttg | 2934 |
| ggatcgggac  | ggccattcgc | gggaaagcgc | tactccagc  | cgcccgttga | gggcttgagt | 2994 |
| agcgaaccgt  | tatcgggcgg | atgccccagc | gtgcgccc   | tcagtgtcc  | gaaaggacca | 3054 |
| ccaaccgcga  | agcccgcgac | accaccgaac | atcttgcccc | agatagccat | gtcatcaacc | 3114 |
| tagcacgccc  | gctcacagcg | gcaaatgaca | gatcgcaggc | taggtgtagg | tgctgatgcg | 3174 |
| ccaaccgccc  | gggcttgccg | tgtggtagaa | gctaggagtt | acgaacttat | cgctgtctca | 3234 |
| tgcttttgag  | gcgcagggtc | ttctgttcgt | ttcatgacgg | atatttttat | gcccaccttg | 3294 |
| atccagactg  | ctacttcgat | ccctttccgc | tctgatgacg | aactgatgga | tcttttgatc | 3354 |
| aagcgtctgc  | caatgtggct | gcagaaagt  | ctgaactggt | tgcgggaagc | ggatcataaa | 3414 |
| tgggttcgga  | ttccggcggg | cgtgctgttc | atgctgggcg | gcgttctgtc | catcctgcct | 3474 |
| gttctgggtc  | tgtggatgct | gccggtcggc | gtgatgttgc | ttgcgcagga | tattccgttc | 3534 |
| ttcgtcgcc   | ttcagggccg | cctcttgccg | tggatcgaa  | gtcaacatcc | ggattggctg | 3594 |
| ggccttcggg  | cgaaaagcgg | cagaagctaa | ccgttcgtct | ggacgtgttt | ctgaagatgt | 3654 |
| gtcagtgtg   | caaccgcgag | ggctgaagcc | agtgggcgct | ctggtggtcg | cgcggcatcg | 3714 |
| agagaagcca  | ccagagacgc | aaagctctgc | tggcggactg | cggccatcgc | gtccagtata | 3774 |
| gcccagaact  | cgggttcag  | tgccacggac | gtccggtgtc | ctgacagaga | caggctgcgt | 3834 |
| ttgacgagat  | cactcattcc | ggttggttct | caaggcgctt | caaagcccat | tgtgcggttt | 3894 |
| cggaaacatc  | agggtccgga | tactcagca  | gtcccgcgc  | agaagatata | agcgacggat | 3954 |
| cggccgagtt  | gccgatcgcg | atcaggacag | ttacgtacga | accggttgcg | tccaatccgt | 4014 |
| ttgaccggag  | agccagaaaa | aaacgtccgg | aatgtcgcat | tatccagccg | caccagtctg | 4074 |
| tcgagttttg  | gtgcaatcag | ctccgggcgg | gcctgaagct | t          |            | 4115 |

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

7/12

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 3

gctgctgagt gatccg 16

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 4

gactgctact tcgatcc 17

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 5

cctacaccta gcctgc 16

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.



8/12

&lt;400&gt; 6

cagtgccgtc atgagg 16

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert  
DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 7

tcctgatctc ggtgcg 16

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert  
DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 8

gatgcttcag cacggc 16

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert  
DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 9

gacgatcacg gaaggc 16

&lt;210&gt; 10

9/12

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert  
DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 10

ggttacgtgg tcgacg 16

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert  
DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 11

ctatacctga caggtcc 17

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert  
DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 12

gcgcgatctg gatacg 16

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

10/12

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 13

cgaggatctc gaacgg 16

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as sense primer for amplifying DNA sequence encoding His-tagged SLDH and promoter.

&lt;400&gt; 14

cggattgcta gcgatggc 18

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as antisense primer for amplifying DNA sequence encoding His-tagged SLDH and promoter.

&lt;400&gt; 15

atcgaggatc ctcaatgatg atgatgatga tgggccggga tggcggc 47

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as sense primer for amplifying DNA sequence of 3' non-coding region of SLDH gene.

11/12

&lt;400&gt; 16

atcgaggatc cattcggctt ttagggtagc 30

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide designed to act as antisense primer for amplifying DNA sequence of 3' non-coding region of SLDH gene.

&lt;400&gt; 17

tagctgagct catgggacag atctgagc 28

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Gluconobacter oxydans

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-terminal amino acid sequence of SLDH.

&lt;400&gt; 18

Met Ile Thr Arg Glu Thr Leu Lys Ser Leu

1 5 10

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide designed to act as PCR primer (sense) for introducing Ssp I restriction site into 5' upstream region of SLDH coding sequence.

&lt;400&gt; 19

taggaatatt tctcatgatt acgcgcgaaa ccc 33

12/12

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (antisense) for introducing Ssp I restriction site into 5' upstream region of SLDH coding sequence.

&lt;400&gt; 20

gatgcttcag cacggc 16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01608

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,  
(C12N 9/04, C12R 1:01) (C12N 15/53, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:19)  
(C12N 1/21, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:02) (C12N 1/21, C12R 1:38)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim N .    |
|-----------|---|--------------------------|
| PX<br>PY  | OSAO ADACHI et al., "Crystallization and properties of NADPH-dependent L-sorbose reductase from Gluconobacter melanogenus IFO 3294", Bioscience Biotechnology Biochemistry (Dec.1999), Vol.63, No.12, p.2137-2143               | 1-5<br>6-22              |
| PY        | WO, 99/20763, A1 (FUJISAWA PHARM CO LTD),<br>29 April, 1999 (29.04.99) (Family: none)   | 1-22                     |
| PX<br>PY  | EP, 955358, A2 (HOFFMANN LA ROCHE & CO AG F),<br>10 November, 1999 (10.11.99)<br>& CA, 2265239, A1 & JP, 2000-060576, A   | 1-10, 12-16<br>11, 17-22 |
| A         | KR, 98069057, A (KOREA ADV INST SCI & TECHNOLOGY),<br>26 October, 1998 (26.10.98) (Family: none)  | 1-22                     |
| A         | YOUNG-MIN PARK et al., "Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by Gluconobacter suboxydans cells immobilized in calcium alginate",<br>Biotechnology Letters (1994), Vol.16, No.4, p.345-348 | 1-22                     |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| * Special categories of cited documents:  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date  | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family  |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |

|   |  |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search<br>26 June, 2000 (26.06.00) | Date of mailing of the international search report<br>04 July, 2000 (04.07.00) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office                        | Authorized officer   |
| Facsimile N .   | Telephone N .  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,  
(C12N 9/04, C12R 1:01) (C12N 15/53, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1/01)  
(C12N 1/21, C12R 1:02) (C12N 1/21, C12R 1:38)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE(STN),  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| P X<br>P Y      | OSAO ADACHI et al., "Crystallization and properties of NADPH-dependent L-sorbose reductase from Gluconobacter melanogenus IFO 3294", Bioscience Biotechnology Biochemistry (Dec. 1999), Vol. 63, No. 12, p. 2137-2143 | 1-5<br>6-22      |
| P Y             | WO, 99/20763, A1 (FUJISAWA PHARM CO LTD) 29.4月.1999 (29.04.99)<br>ファミリーなし   | 1-22             |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.06.00

国際調査報告の発送日

04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子



4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

# PATENT COOPERATION TREATY

WO 00/55329  
PCT/JP00/01608

PCT

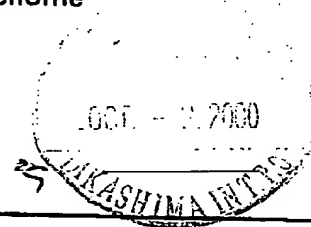
## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKASHIMA, Hajime  
Yuki Building  
3-9, Hiranomachi 3-chome  
Chuo-ku  
Osaka-shi  
Osaka 541-0046  
JAPON



|  |  |  |
|--|--|--|
| Date of mailing (day/month/year)<br>21 September 2000 (21.09.00) |  |  |
| Applicant's or agent's file reference<br>09348                   |  |  |
| International application No.<br>PCT/JP00/01608                  | International filing date (day/month/year)<br>16 March 2000 (16.03.00) | Priority date (day/month/year)<br>17 March 1999 (17.03.99) |
| Applicant<br>FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al             |  |  |

### IMPORTANT NOTICE

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
CA,CN,EP,JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 21 September 2000 (21.09.00) under No. WO 00/55329

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br><br>J. Zahra |
| Facsimile No. (41-22) 740.14.35   | Telephone No. (41-22) 338.83.38    |

Form PCT/IB/308 (July 1996)

3523897



D 0 6 NOV 2000

WIPO

PCT

P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

〔PCT36条及びPCT規則70〕

|  |   |                         |
|--|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 09348  | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/<br>IPEA/416)を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/JPO0/01608   | 国際出願日<br>(日.月.年) 16.03.00                             | 優先日<br>(日.月.年) 17.03.99 |
| 国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60, |   |                         |
| 出願人(氏名又は名称)<br>藤沢薬品工業株式会社  |   |                         |

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☒ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見

|   |                            |         |
|---|----------------------------|---------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日<br>04.09.00                                    | 国際予備審査報告を作成した日<br>16.10.00 |         |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁(IPEA/JP)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員)<br>山村 祥子   | 4N 9217 |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3488                                       |                            |         |

## 1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☒ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-22

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-22

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-22

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

## 文献1:

KR, 98069057, A (KOREA ADV INST SCI & TECHNOLOGY)  
26.10月.1998 (26.10.98)

## 文献2:

YOUNG-MIN PARK et al., "Effect of toluene-permeabilization  
on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by Gluconobacter  
suboxydans cells immobilized in calcium alginate",  
Biotechnology Letters(1994), Vol.16, No.4, p.345-348

請求の範囲1-22に係る発明は、国際調査報告で引用された文献1、及び文献2には開示されておらず、新規性を有する。

請求項1に記載された理化学的性質を有する酵素、配列番号1に示されるアミノ酸配列及び配列番号2で示されるDNAは、上記の何れの文献にも開示されていない。

## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

| 出願番号<br>特許番号               | 公知日<br>(日. 月. 年) | 出願日<br>(日. 月. 年) | 優先日 (有効な優先権の主張)<br>(日. 月. 年) |
|----------------------------|------------------|------------------|------------------------------|
| WO, 99/20763, A1<br>[E, Y] | 29. 04. 99       | 13. 10. 98       | 17. 10. 97                   |
| EP, 955358, A<br>[E, XY]   | 10. 11. 99       | 08. 03. 99       | 13. 03. 98                   |

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

| 書面による開示以外の開示の種類 | 書面による開示以外の開示の日付<br>(日. 月. 年) | 書面による開示以外の開示に言及している<br>書面の日付 (日. 月. 年) |
|-----------------|------------------------------|--|
|-----------------|------------------------------|--|

D 0 6 NOV 2000

WIPO

PCT

## P C T


## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

〔PCT36条及びPCT規則70〕

|   |   |                         |
|---|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 09348   | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/<br>IPEA/416）を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/JPO0/01608  | 国際出願日<br>(日.月.年) 16.03.00                             | 優先日<br>(日.月.年) 17.03.99 |
| 国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60, |   |                         |
| 出願人 (氏名又は名称)<br>藤沢薬品工業株式会社  |   |                         |

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☒ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

|  |   |         |
|--|---|---------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日<br>04.09.00                                     | 国際予備審査報告を作成した日<br>16.10.00  |         |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁 (IPEA/JP)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>山村 様子  | 4N 9217 |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3488  |   |         |

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                          |            |         |        |                      |
|--------------------------|------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
|                          | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
|                          | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
|                          | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
|                          | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
|                          | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
|                          | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
|                          | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
|                          | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
|                          | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☒ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-22  
請求の範囲有  
無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-22  
請求の範囲有  
無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-22  
請求の範囲有  
無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

## 文献1:

KR, 98069057, A (KOREA ADV INST SCI & TECHNOLOGY)  
26.10月.1998 (26.10.98)

## 文献2:

YOUNG-MIN PARK et al., "Effect of toluene-permeabilization  
on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by Gluconobacter  
suboxydans cells immobilized in calcium alginate",  
Biotechnology Letters(1994), Vol.16, No.4, p.345-348

請求の範囲1-22に係る発明は、国際調査報告で引用された文献1、及び文献2には開示されておらず、新規性を有する。

請求項1に記載された理化学的性質を有する酵素、配列番号1に示されるアミノ酸配列及び配列番号2で示されるDNAは、上記の何れの文献にも開示されていない。

## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

| 出願番号<br>特許番号               | 公知日<br>(日. 月. 年) | 出願日<br>(日. 月. 年) | 優先日 (有効な優先権の主張)<br>(日. 月. 年) |
|----------------------------|------------------|------------------|------------------------------|
| WO, 99/20763, A1<br>[E, Y] | 29. 04. 99       | 13. 10. 98       | 17. 10. 97                   |
| EP, 955358, A<br>[E, XY]   | 10. 11. 99       | 08. 03. 99       | 13. 03. 98                   |

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

| 書面による開示以外の開示の種類 | 書面による開示以外の開示の日付<br>(日. 月. 年) | 書面による開示以外の開示に言及している<br>書面の日付 (日. 月. 年) |
|-----------------|------------------------------|--|
|-----------------|------------------------------|--|





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01608

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01608

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

|                               |        |      |     |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-22 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 1-22 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-22 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |

## 2. Citations and explanations

Document 1: KR, 98069057, A (Korea Adv. Inst. Sci. & Technology), 26 October, 1998 (26.10.98)

Document 2: Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells immobilized in calcium alginate, (Young-Min Park et al.), Biotechnology Letters, 1994, Vol. 16, No. 4, pages 345-348

The subject matter of claims 1-22 is not disclosed in either of documents 1 or 2 cited in the ISR, and is thus considered to be novel.

The enzyme having the physico-chemical properties disclosed in claim 1, the amino acid sequence represented by sequence no. 1, and the DNA represented by sequence no. 2, are not disclosed in either of the above-mentioned documents.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01608

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

| Application No.<br>Patent No. | Publication date<br>(day/month/year) | Filing date<br>(day/month/year) | Priority date (valid claim)<br>(day/month/year) |
|-------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|---|
| WO/99/00763, A1<br>[E, Y]     | 20 April 1999 (20.04.1999)           | 13 October 1998 (13.10.1998)    | 17 October 1997 (17.10.1997)                    |
| EP, 953338, A<br>[E, XY]      | 10 November 1999 (10.11.1999)        | 08 March 1999 (08.03.1999)      | 13 March 1998 (13.03.1998)                      |

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

| Kind of non-written disclosure | Date of non-written disclosure<br>(day/month/year) | Date of written disclosure<br>referring to non-written disclosure<br>(day/month/year) |
|--------------------------------|--|---|
|--------------------------------|--|---|

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKASHIMA, Hajime  
Fujimura Yamato Seimei Building  
2-14, Fushimimachi 4-chome  
Chuo-ku  
Osaka-shi  
Osaka 541-0044  
JAPONDate of mailing (day/month/year)  
05 September 2001 (05.09.01)Applicant's or agent's file reference  
09348

## IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.  
PCT/JP00/01608International filing date (day/month/year)  
16 March 2000 (16.03.00)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

## Name and Address

TAKASHIMA, Hajime  
Yuki Building  
3-9, Hiranomachi 3-chome  
Chuo-ku  
Osaka-shi  
Osaka 541-0046  
Japan

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

## Name and Address

TAKASHIMA, Hajime  
Fujimura Yamato Seimei Building  
2-14, Fushimimachi 4-chome  
Chuo-ku  
Osaka-shi  
Osaka 541-0044  
Japan

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned  
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Masashi HONDA

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

# PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

25 October 2000 (25.10.00)

International application No.

PCT/JP00/01608

Applicant's or agent's file reference

09348

International filing date (day/month/year)

16 March 2000 (16.03.00)

Priority date (day/month/year)

17 March 1999 (17.03.99)

Applicant

SHIBATA, Takashi et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

04 September 2000 (04.09.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Antonia Muller

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

TAKASHIMA, Hajim  
Yuki Building  
3-9, Hiranomachi 3-chome  
Chuo-ku  
Osaka-shi  
Osaka 541-0046  
JAPON

JUL 03 2000

|  |  |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year)<br>20 June 2000 (20.06.00)          | <b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>  |
| Applicant's or agent's file reference<br>09348                       |  |
| International application No.<br>PCT/JP00/01608                      | International filing date (day/month/year)<br>16 March 2000 (16.03.00) |
| International publication date (day/month/year)<br>Not yet published | Priority date (day/month/year)<br>17 March 1999 (17.03.99)             |
| Applicant<br>FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al                 |  |

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

| <u>Priority date</u>      | <u>Priority application No.</u> | <u>Country or regional Office<br/>or PCT receiving Office</u> | <u>Date of receipt<br/>of priority document</u> |
|---------------------------|---------------------------------|---|---|
| 17 Marc 1999 (17.03.99) ✓ | 11/72810                        | JP  | 05 June 2000 (05.06.00)                         |
| 06 Augu 1999 (06.08.99) ✓ | 11/224679                       | JP  | 05 June 2000 (05.06.00)                         |

The International Bureau of WIP  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Tessad I PAMPLIEGA *tel*

Telephone No. (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/304 (July 1998)

003362962

EP



PCT

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
[PCT 18 条、PCT 規則43、44]

|                            |   |                         |
|----------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 09348    | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)<br>及び下記5を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/JPO0/01608   | 国際出願日<br>(日.月.年) 16.03.00                               | 優先日<br>(日.月.年) 17.03.99 |
| 出願人 (氏名又は名称)<br>藤沢薬品工業株式会社 |   |                         |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,  
(C12N 9/04, C12R 1:01) (C12N 15/53, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1/01)  
(C12N 1/21, C12R 1:02) (C12N 1/21, C12R 1:38)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| PX<br>PY        | OSAO ADACHI et al., "Crystallization and properties of NADPH-dependent L-sorbose reductase from Gluconobacter melanogenus IFO 3294", Bioscience Biotechnology Biochemistry (Dec. 1999), Vol. 63, No. 12, p. 2137-2143 | 1-5<br>6-22      |
| PY              | WO, 99/20763, A1 (FUJISAWA PHARM CO LTD) 29.4月.1999 (29.04.99)<br>ファミリーなし   | 1-22             |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.06.00

国際調査報告の発送日

04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子



4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |   |                                 |
|-----------------------|---|---------------------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号                |
| P X<br>P Y            | EP, 955358, A2 (HOFFMANN LA ROCHE & CO AG F)<br>10.11月.1999 (10.11.99)<br>& CA, 2265239, A1 & JP, 2000-060576, A  | <u>1-10, 12-16</u><br>11, 17-22 |
| A                     | KR, 98069057, A (KOREA ADV INST SCI & TECHNOLOGY)<br>26.10月.1998 (26.10.98)<br>ファミリーなし  | 1 - 2 2                         |
| A                     | YOUNG-MIN PARK et al., "Effect of toluene-permeabilization<br>on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by Gluconobacter<br>suboxydans cells immobilized in calcium alginate",<br>Biotechnology Letters(1994) , Vol.16 , No.4 , p.345-348 | 1 - 2 2                         |